

博 士 学 位 論 文

ノルアドレナリンによるアストロサイトを介した  
神経保護作用に関する研究

門 居 久 嗣

摂南大学大学院  
薬学研究所

## 目 次

緒論	1
本論	
第 1 章 アストロサイトにおけるノルアドレナリンによる GSH の 産生誘導	3
実験方法	5
実験結果	
1.1 ヒトアストロサイトーマ U-251 MG 細胞の細胞内 GSH 量 に対するノルアドレナリンの影響	9
1.2 U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる GSH 産生 誘導への GCL の関与	11
1.3 U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる GSH 産生 誘導への $\beta_3$ 受容体の関与	13
1.4 U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる GSH 産生 誘導への MAPK 系の関与	15
1.5 マウス初代培養アストロサイトの細胞内 GSH 量に対する ノルアドレナリンの影響	18
考察	21
第二章 ノルアドレナリンによるアストロサイトを介した 神経保護作用	24
実験方法	25
実験結果	
2.1 U-251 MG 細胞と SH-SY5Y 細胞の混合培養系における ノルアドレナリンによる $H_2O_2$ 誘発神経細胞死抑制作用	29
2.2 初代培養神経細胞とアストロサイトの混合培養系における ノルアドレナリンによるアストロサイトを介した神経保護 作用	36
2.3 初代培養ドパミン神経細胞とアストロサイトの混合培養系 におけるノルアドレナリンによるアストロサイトを介した 神経保護作用	42
考察	45
第三章 脳内 GSH 量と MPTP 誘発ドパミン神経細胞死に対する $\beta_3$ 受容体選択的作用薬 SR58611A の影響	47
実験方法	48



実験結果	
3.1 脳内 GSH 量に対する $\beta_3$ 受容体選択的作用薬 SR58611A 投与 の影響	50
3.2 MPTP 誘発ドパミン神経細胞死に対する SR58611A 投与の影響	55
考察	56
統括	58
謝辞	61
引用文献	62

## 緒 論

脳の重量は成人体重の約 2% を占め、その活動のために酸素を消費しつづけることが必要であり、脳の酸素消費量は全身の約 20% に相当する<sup>1,2)</sup>。消費された酸素からは、スーパーオキシドアニオンなどの活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) が産生されるため、脳は ROS が多量に発生する組織である<sup>3,4)</sup>。ROS は、核酸や蛋白質、脂質を酸化し、細胞を傷害する。このため、細胞には ROS による酸化的ストレスに対する防御系として、ROS を代謝し無毒化する抗酸化物質や抗酸化酵素が存在する<sup>5)</sup>。アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患患者の脳では、病変部位で脂質過氧化物等の酸化的ストレスマーカーが増加していること<sup>6,7)</sup>、また、ROS が種々の培養神経細胞に細胞死を誘導することから<sup>8-10)</sup>、神経変性疾患での神経細胞死には、ROS の産生増加、抗酸化防御系の破綻、あるいはその両者による酸化的ストレスが関与すると考えられている。

グリア細胞の一種であるアストロサイトは、神経栄養因子の産生、神経細胞に対する栄養の供給、過剰な神経伝達物質の除去、細胞外イオン濃度の調節等により神経細胞の生存維持に重要な役割を果たしている<sup>11-13)</sup>。また、アストロサイトは、神経細胞の酸化的ストレス障害からの保護に重要な役割を果たしている。アストロサイトは、脳内の他の細胞に比べ抗酸化物質であるグルタチオン (GSH) の含有量が多く、細胞外の ROS の消去や隣接する神経細胞への GSH の供給を介して、神経細胞を酸化的ストレスによる障害から保護している<sup>14-16)</sup>。GSH は、酸化的ストレスに対する防御系において中心的な役割を果たしており<sup>17)</sup>、神経細胞の GSH 合成はアストロサイトからの GSH 供給に依存しているため<sup>18)</sup>、アストロサイトの GSH 産生及びその神経細胞への供給は、神経細胞の生存維持にきわめて重要である。

脳内のノルアドレナリン神経細胞の細胞体は、主に青斑核に存在し、そこから脳全体に神経線維を投射している<sup>19)</sup>。ノルアドレナリン神経は、シナプスのみならず、細胞体や軸索瘤からもノルアドレナリンを細胞外へ放出する<sup>20)</sup>。このことから、ノルアドレナリンは、神経細胞だけでなくアストロサイトなどのグリア細胞の機能調節にも関与することが示唆されており、実際に、培養アストロサイトを用いた検討から、ノルアドレナリンは、アストロサイトの Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性やグルタミン酸取り込み能を促進することが報告されている<sup>21-23)</sup>。また、ノルアドレナリンは、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患において、神経保護作用を有することが示唆されている。アルツハイマー病やパーキンソン病患者の脳では、発症初期から青斑核のノルアドレナリン神経細胞が脱落することが知られている<sup>24-26)</sup>。また、アルツハイマー病やパーキンソン病の動物モデルにおいて、選択的神経毒によりノルアドレナリン神経を脱落させることで、コリン作動性神経細胞やドパミン作動性神経細胞が脆弱になることが報告されている<sup>27-29)</sup>。さらに、これらの動物モデルでの神経細胞死には、酸化的ストレスが関与すると考えられている<sup>30, 31)</sup>。これらのことから、脳内ノルアドレナリン量の減少は、神経細胞の酸化的ストレスに対する感

受性を増大させることが示唆される。アストロサイトでの GSH 産生とその神経細胞への供給は、隣接する神経細胞の酸化ストレスに対する感受性に重要な影響を与えるため、ノルアドレナリンは、アストロサイトの GSH 産生やその神経細胞への供給に影響を与える可能性が考えられる。しかしながら、アストロサイトの GSH 産生やその神経細胞への供給に対するノルアドレナリンの影響はほとんど明らかにされていない。

本研究ではノルアドレナリンの神経保護作用を明らかにする目的で、アストロサイトの GSH 産生とその神経細胞への供給に対するノルアドレナリンの影響について検討した。

## 本 論

### 第一章 アストロサイトにおけるノルアドレナリンによる GSH 産生誘導機構

GSH は、GSH 合成の律速酵素である glutamate-cysteine ligase (GCL) (別称  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase:  $\gamma$ -GCS) と GSH 合成酵素の連続した反応により、グルタミン酸、システイン及びグリシンから合成されるトリペプチドである<sup>32)</sup>。GSH は、システイン残基のチオール基を介して、ヒドロキシルラジカル等の ROS を消去し、無毒化する。また、GSH は、過酸化水素や脂質過酸化物等の過酸化物を代謝するグルタチオンペルオキシダーゼの補因子として働き、抗酸化作用を発揮する<sup>33,34)</sup>。これらの過程で GSH は酸化され、酸化型 GSH (GSSG) へと変換されるが、GSSG はグルタチオンレダクターゼの働きにより、NADPH 依存的に GSH へと還元され、再び ROS の代謝に利用される<sup>32-34)</sup>。神経細胞を含む種々の細胞において、GSH 合成を阻害する薬物等で細胞内 GSH 量を減少させることにより、ROS による酸化的ストレスに対する感受性が増大することが示されており<sup>35,36)</sup>、GSH は ROS による酸化的ストレス障害に対する防御系において、中心的な役割を果たしている。

GSH の基質であるシステインは酸化されやすいため、多くの細胞はシステインの酸化二量体であるシスチンを取り込み、GSH 合成に利用する<sup>32)</sup>。しかし、神経細胞はシスチンの取り込み能に乏しく、神経細胞の GSH 合成に必要なシステインは、アストロサイトからの GSH 供給に依存していることが知られている<sup>35)</sup>。アストロサイトで合成された GSH の一部は細胞外へ放出され、アストロサイトの細胞膜上に存在する  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼによりグルタミン酸とシステイニルグリシンに分解される<sup>35)</sup>。さらに、システイニルグリシンはジペプチダーゼによりシステインとグリシンに分解され、産生されたシステインは神経細胞に取り込まれて GSH 合成に利用される<sup>35,36)</sup>。神経細胞は、アストロサイトに比べ抗酸化物質や抗酸化酵素の含有量が少なく、また、神経細胞膜には脂質過酸化を受けやすい不飽和脂肪酸が多く含まれているため、ROS による酸化的ストレスに対して脆弱である<sup>35,37-39)</sup>。これらのことから、アストロサイトにおける GSH の産生とその神経細胞への供給は、ROS による酸化的ストレス障害からの神経細胞の保護に非常に重要な役割を果たしていると考えられる。

ノルアドレナリンは、7 回膜貫通型の G 蛋白質共役型受容体であるアドレナリン受容体を介して、その生理作用を発現する<sup>19)</sup>。アドレナリン受容体には、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$  及び  $\beta$  の 3 つのタイプの受容体が存在し、さらに各タイプの受容体には、3 つずつのサブタイプ ( $\alpha_1$ :  $\alpha_{1A}$ 、 $\alpha_{1B}$ 、 $\alpha_{1D}$ ;  $\alpha_2$ :  $\alpha_{2A}$ 、 $\alpha_{2B}$ 、 $\alpha_{2C}$ ;  $\beta$ :  $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 、 $\beta_3$ ) が存在する。ラット、マウス及びニワトリの初代培養アストロサイトを用いた研究において、アストロサイトには、アドレナリン受容体サブタイプとして、 $\alpha_{1A}$ 、 $\alpha_{2A}$ 、 $\beta_1$ 、 $\beta_2$  及び  $\beta_3$  受容体が発現しており、それらの受容体を介して、ノルアドレナリンが、brain-derived neurotrophic factor 合成、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase 活性、グルタミン酸取り込み能及びグルコース取り込み能を促進することが報告されている<sup>21-23)</sup>。

40-42)。

本章では、アストロサイトの GSH 産生に対するノルアドレナリンの影響について、ヒトアストロサイトーマ U-251 MG 細胞及びマウス初代培養アストロサイトを用いて検討した。



## 実験方法

### 1) 薬物及び抗体

ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) は Nichirei Bioscience Inc. (Tokyo, Japan) より購入した。Streptomycin/penicillin 溶液、fungizone、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、5-sulfosalicylic acid、atenolol、SR 59230A、dibutyl cAMP (DBcAMP)、forskolin、pertussis toxin (PTX) は Sigma (St.Louise, MO, U.S.A) より購入した。ノルアドレナリン、butoxamine は Fluka (Buchs, Switzerland) より購入した。SP600125 は Tocris Cookson Inc. (Bristol, UK) より購入した。Dimethylsulfoxide (DMSO)、tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)、glycine、sodium fluoride (NaF)、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 及び sodium dodecyl sulfate (SDS)、5-sulfosalicylic acid (5-SSA) は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より購入した。Tween-20、Triton X-100 は ICN Biomedicals Inc. (Aurora, OH, U.S.A) より購入した。抗  $\gamma$ -GCS catalytic subunit 抗体及び抗  $\beta_3$  受容体抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A) より購入した。抗リン酸化 ERK 抗体、抗 ERK 抗体、抗リン酸化 JNK 抗体及び抗 JNK 抗体は Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, U.S.A) より購入した。その他の試薬は、Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan) より購入した。

### 2) U-251 MG 細胞の培養及び調製

U-251 MG 細胞 (Japanese Collection of Research Bioresource, Osaka, Japan) は、10% FBS、100  $\mu$ g/mL streptomycin、100 IU/mL penicillin、1  $\mu$ g/mL fungizone を含む DMEM (10% FBS/DMEM) 中にて、5% CO<sub>2</sub>/95% air、37°C で培養した。細胞内 GSH 量の測定、Western blot 法及び RNA の調製用には  $1 \times 10^6$  cells/dish の密度で 10 cm dish に、細胞外 GSH 量の測定には、 $5 \times 10^4$  cells/well の密度で 24 well plate に播種した。

### 3) マウス初代培養アストロサイトの調製

生後 0~2 日のマウス的大脑皮質を摘出し、細断後、DMEM に懸濁し、800  $\times$  rpm で 5 分間遠心した。上清を除去後、沈殿した細胞を、0.25% Trypsin-EDTA 溶液で分散し、37°C で 5 分間インキュベートした後、Trypsin-EDTA 溶液と同量の 10% FBS/DMEM を加え反応を停止させた。110  $\times$  g で 5 分間遠心した後、上清を除去し、沈殿した細胞を 10% FBS/DMEM に懸濁し、これを 100  $\mu$ m セルストレイナー (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) に通じた後、75 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、5% CO<sub>2</sub>/95% air、37°C で培養した。培養液は 3 日に 1 度置換し、細胞が confluent になるまで 14-20 日間培養した後、フラスコを振とう (200  $\times$  rpm、overnight、37°C) し、上清を除去、フラスコを PBS (一) で 2 回洗浄した。フラスコに接着した細胞に、0.25% Trypsin-EDTA 溶液を加え、37°C で 5 分間反応させることにより、細胞をフラスコから剥離させた。細胞を含む Trypsin-EDTA 溶液を遠心管に回収した後、同量の 10% FBS/DMEM を加え反応を停止させ、室温、110  $\times$  g で 5 分間遠心することにより細胞



を沈殿させた。上清を除去後、沈殿した細胞を 10% FBS/DMEM に懸濁し、細胞内 GSH 量の測定及び Western blot 法には  $3 \times 10^5$  cells/dish の密度で 6 cm dish に播種した。本方法により得られた細胞は、95%以上が GFAP 陽性を示す、アストロサイトであった。

#### 4) 薬物処置

ノルアドレナリンは、100 IU/mL penicillin、1  $\mu$ g/mL fungizone を含み、血清を含まない DMEM (Serum free DMEM: SF/DMEM) に溶解し、希釈した。PTX は滅菌水に溶解させた後、SF/DMEM に希釈した。その他の試薬は DMSO に溶解させた後、SF/DMEM に希釈した。ノルアドレナリンは、細胞播種 24 時間後に、培養液をノルアドレナリンを含む培養液へと置換し、処置した。Phenoxybenzamine、propranolol、atenolol、butoxamine、SR 59230A、PD98059、SP600125 及び PTX は、ノルアドレナリン処置の 1 時間前に培養液に添加し、ノルアドレナリンと共存させた。

#### 5) 細胞内 GSH 量の測定

細胞内 GSH 量は、DTNB リサイクリング法により測定した<sup>43)</sup>。薬物処置後、細胞を PBS (一)で 2 回洗浄し、スクレーパーで搔破することにより細胞をエッペンドルフチューブに回収した。4°C、500  $\times g$  で 5 分間遠心した後、上清をアスピレートし、沈殿した細胞に 80  $\mu$ L の 10 mM HCl を加え、細胞を懸濁させた。Freezing-thawing (−30°C、15 分、37°C、5 分) を 3 回繰り返すことにより細胞を破碎した後、4°C、15,000  $\times g$  で 10 分間遠心し、上清に 40  $\mu$ L の 10% 5-SSA を加えて除蛋白を行った。30 分間氷上で静置後、4°C、15,000  $\times g$  で 10 分間遠心し、上清をサンプルとした。サンプル 10  $\mu$ L に超純水を 90  $\mu$ L 加え、さらに reaction mixture (100 mM sodium phosphate、1 mM EDTA、0.3 mM DTNB、0.4 mM NADPH、1 Unit/mL glutathione reductase、pH 7.5) を 100  $\mu$ L 加えた後、405 nm の波長で吸光度の増加を測定した。標準液として酸化型 GSH を用いて検量線を作成し、サンプル中の GSH 量を算出した。

#### 6) 細胞外 GSH 量の測定

薬物処置後、培養液を 300  $\mu$ L の minimal medium (110 mM NaCl、5.4 mM KCl、44 mM NaHCO<sub>3</sub>、0.8 mM MgSO<sub>4</sub>、1.8 mM CaCl<sub>2</sub>、5 mM glucose、0.92 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、100  $\mu$ M acivicin) に置換して、3 時間インキュベートした後、minimal medium を回収してサンプルとした。サンプル 10  $\mu$ L に 0.11% 5-SSA を 90  $\mu$ L 加え、さらに reaction mixture (100 mM sodium phosphate、1 mM EDTA、0.3 mM DTNB、0.4 mM NADPH、1 Unit/mL glutathione reductase、pH 7.5) を 100  $\mu$ L 加えた後、405 nm の波長で吸光度の増加を測定した。標準液として酸化型 GSH を用いて検量線を作成し、minimal medium 中の GSH 量を算出した。

#### 7) Western blot 法

薬物処置後、細胞を氷冷 PBS (一)で 2 回洗浄し、スクレーパーで搔破することにより細

胞をエッペンドルフチューブに回収した。4°C、500 × g で 5 分間遠心した後、上清をアスピレートし、沈殿した細胞に lysis buffer (10 mM HEPES/KOH、10 mM KCl、0.1 mM EDTA、0.1 mM EGTA、1 mM DTT、0.5 mM PMSF、1% NP-40、pH 7.5) を加え、20 分間氷上に静置して可溶化した。4°C、15,000 × g で 5 分間遠心し、その上清をサンプルとした。また、リン酸化 ERK 及びリン酸化 JNK の検討では、細胞を lysis buffer (20 mM Tris-HCl、2% SDS、10 mM NaF、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、pH 7.5) で溶解し、100°C、10 分間熱処理後、20°C、15,000 × g で 10 分間遠心し、上清をサンプルとした。サンプルを蛋白定量した後、5 × Laemmli buffer (125 mM Tris-HCl、25% glycerol、5% SDS、0.2% bromophenol blue、10% 2-mercaptoethanol、pH 7.5) を加えて 100°C、10 分間熱処理を行い、蛋白を変性させた。サンプルの等量の蛋白質 (1-20 µg) を 10% の SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動により分離した後、immobilon-P transfer membrane (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) に転写した。その membrane を 0.05% Tween-20 を含む Tris-buffered saline (TBS-T) で洗浄した後 (室温、5 分 × 3 回)、skim milk (1-5%) を含む TBS-T で blocking した (室温、1 時間)。Membrane を TBS-T で洗浄し (室温、5 分 × 2 回)、skim milk を含む TBS-T で希釈した一次抗体 (下記) と反応させた (4°C、overnight)。その後、TBS-T で membrane を洗浄し (室温、5 分 × 3 回)、skim milk を含む TBS-T で希釈した HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体 (1:1,000-2,000) または HRP 標識抗 goat IgG 抗体 (1:1,000) と反応させた (室温、3 時間)。TBS-T で洗浄 (室温、5 分 × 4 回) した後、Enhanced Chemi-Luminescence (ECL) 法により蛋白質バンドを X 線フィルム (Fujifilm. Co. Ltd., Tokyo, Japan) により検出した。

一次抗体 抗  $\gamma$ -GCS catalytic subunit 抗体 (1:1,000)

抗  $\beta_3$  受容体抗体 (1:1,000)

抗リン酸化 ERK 抗体 (1:2,000)

抗 ERK 抗体 (1:2,000)

抗リン酸化 JNK 抗体 (1:1,000)

抗 JNK 抗体 (1:1,000)

## 8) RNA の調製

細胞を PBS (－) で 2 回洗浄し、SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて、Promega 社の推奨方法に従い RNA を調製した。

#### 9) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

RNA を、吸光度測定により定量し、滅菌水を加えて 1  $\mu$ g RNA/8.8  $\mu$ L になるように希釈し、0.1 g/L dN6、5  $\times$  1 st strand、0.1 M dithiothreitol (DTT)、5 mM dNTP をそれぞれ 2  $\mu$ L、4  $\mu$ L、2  $\mu$ L、2  $\mu$ L 加え混合した。ここに M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1  $\mu$ L を加え、逆転写反応を行った (37°C、60 分)。逆転写反応産物を滅菌水で 20 倍希釈した後、希釈した逆転写反応産物 2  $\mu$ L に各プライマーと Taq DNA polymerase を加え、下記の条件で PCR を行った。PCR 産物を、ethidium bromide を含む 2% agarose/TBE gel を用いて電気泳動した後、UV 260 nm 励起により可視化した。

#### PCR 条件

95°C 30 秒、55°C 1 分、72°C 1 分を 40 サイクル

#### プライマーデザイン

$\beta$ 1-receptor	forward	TCGTGTGCACCGTGTGGGCC
	reverse	AGGAAACGGCGCTCGCAGCTGTCTG
$\beta$ 2-receptor	forward	GCCTGCTGACCAAGAATAAGGCC
	reverse	CCCATCCTGCTCCACCT
$\beta$ 3-receptor	forward	GCTCCGTGGCCTCACGAGAA
	reverse	CCCAACGGCCAGTGGCCAGTCAGCG

#### 10) データ解析

実験結果は、3-4 例の平均値  $\pm$  S.E.M. として表した。有意差検定は ANOVA を行い、post-hoc test として Scheffe's test または Dunnett's test を行った。



## 実験結果

### 1.1 ヒトアストロサイトーマ U-251 MG 細胞の細胞内 GSH 量に対するノルアドレナリンの影響

ヒトアストロサイトーマ U-251 MG 細胞において、ノルアドレナリンにより GSH の産生誘導がみられるか否かを明らかにする目的で、細胞内 GSH 量を DTNB リサイクリング法により測定した。

U-251 MG 細胞において、ノルアドレナリン (1-100  $\mu\text{M}$ ) の 24 時間処置は、その濃度依存的に細胞内 GSH 量を増加させた (Fig. 1A)。また、ノルアドレナリン (10  $\mu\text{M}$ ) を 12 時間以上処置することにより、細胞内 GSH 量は有意に増加した (Fig. 1B)。

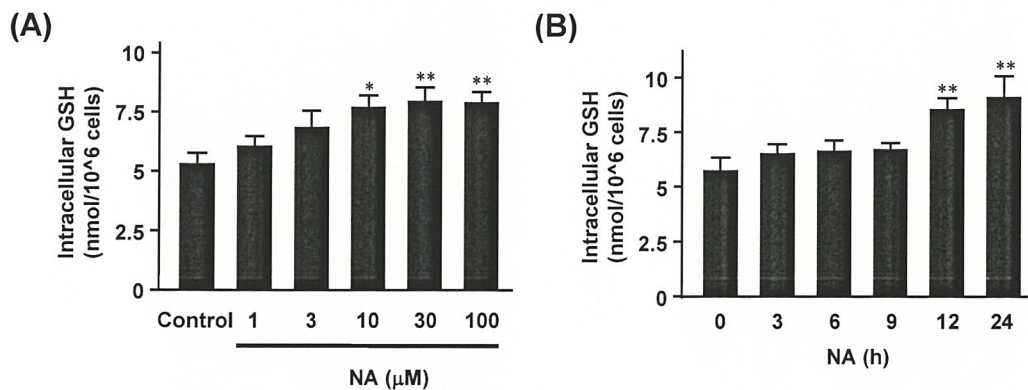


Figure 1. Effect of noradrenaline on the concentration of intracellular GSH in U-251 MG cells.

U-251 MG cells were treated with noradrenaline (NA) at the indicated concentrations for 24 h (A) or with 10  $\mu\text{M}$  NA for various times (B). Intracellular GSH concentrations were determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Control

次に、U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる細胞内 GSH 量の増加へのアドレナリン受容体の関与を明らかにする目的で、アドレナリン受容体作用薬及び遮断薬の影響について検討した。

非選択的  $\alpha$  受容体遮断薬 phenoxybenzamine (10  $\mu\text{M}$ ) は、ノルアドレナリン (10  $\mu\text{M}$ ) による細胞内 GSH 量の増加に影響を与えなかった (Fig. 2A)。また、 $\alpha_1$  受容体作用薬 phenylephrine (1-100  $\mu\text{M}$ ) 及び  $\alpha_2$  受容体作用薬 clonidine (1-100  $\mu\text{M}$ ) は、いずれの濃度においても細胞内 GSH 量に影響を与えなかった (Fig. 2B)。一方、非選択的  $\beta$  受容体遮断薬 propranolol (50  $\mu\text{M}$ ) は、10  $\mu\text{M}$  ノルアドレナリンによる細胞内 GSH 量の増加をほぼ完全に阻害した (Fig. 2C)。また、非選択的  $\beta$  受容体作用薬 isoproterenol は、30 及び 100  $\mu\text{M}$  の濃

度で細胞内 GSH 量を有意に増加させた (Fig. 2D)。

これらの結果から、U-251 MG 細胞においてノルアドレナリンは  $\beta$  受容体を介して細胞内 GSH 量を増加させることが示唆された。

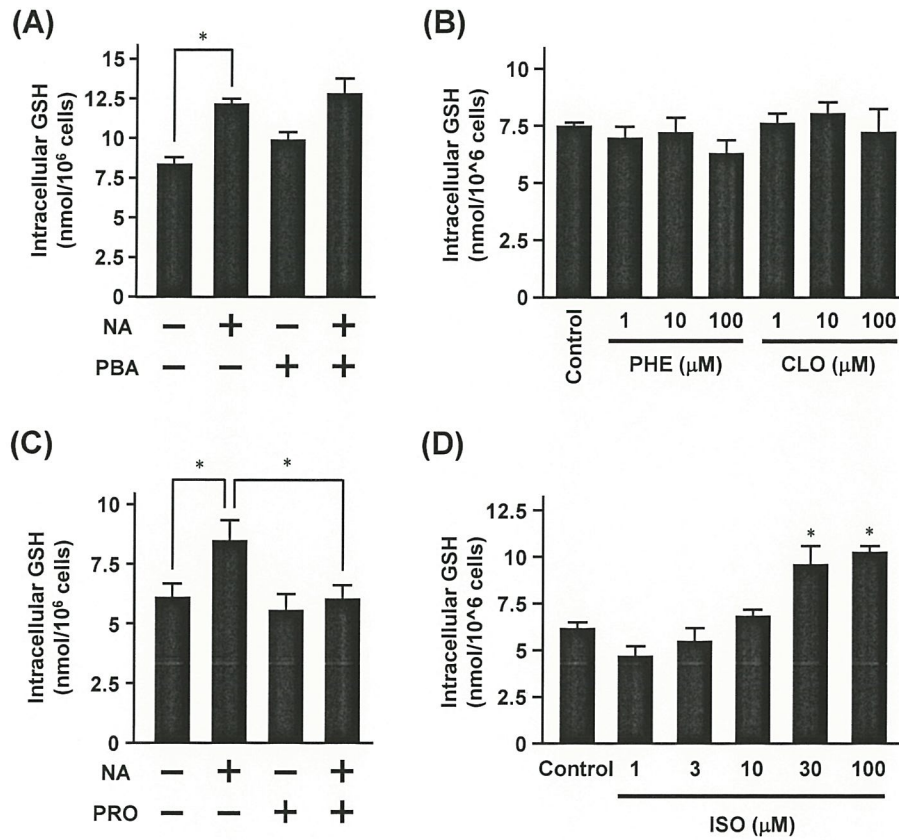


Figure 2. Noradrenaline increases the intracellular GSH concentration by stimulating  $\beta$ -adrenoceptors in U-251 MG cells.

(A, C) U-251 MG cells were treated for 24 h with 10  $\mu$ M noradrenaline (NA) in the absence or presence of 10  $\mu$ M phenoxybenzamine (PBA; A) or 50  $\mu$ M propranolol (PRO; C). Intracellular GSH concentrations were determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P$  < 0.05 (B, D) U-251 MG cells were treated with phenylephrine (PHE), clonidine (CLO; B) or isoproterenol (ISO; D) at the indicated concentrations for 24 h. Intracellular GSH concentrations were determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 3-4 independent experiments. \* $P$  < 0.05 vs. Control

## 1.2 U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる GSH 産生誘導への GCL の関与

U-251 細胞におけるノルアドレナリンによる細胞内 GSH 量の増加への GSH 合成の律速酵素である GCL の関与を明らかにする目的で、GCL の触媒サブユニット (GCLc) の発現量に対するノルアドレナリンの影響について、Western blot 法により検討した。

ノルアドレナリン (1-100  $\mu\text{M}$ ) の 24 時間処置は、その濃度依存的に GCLc の発現量を増加させた (Fig. 3A)。また、その増加は propranolol (50  $\mu\text{M}$ ) により有意に阻害された (Fig. 3B)。

アストロサイトは細胞外に GSH を放出することが知られている<sup>44)</sup>。このことから、ノルアドレナリンはアストロサイトの細胞外への GSH 放出を抑制することにより、細胞内 GSH 量を増加させる可能性が考えられる。そこで、U-251 MG 細胞による細胞外への GSH 放出に対するノルアドレナリンの影響について検討した。

ノルアドレナリン (10-100  $\mu\text{M}$ ) の 24 時間処置は、U-251 MG 細胞から細胞外への GSH 放出量を有意に増加させた (Fig. 3C)。

これらの結果から、U-251 MG 細胞においてノルアドレナリンは、 $\beta$  受容体を介して GCLc を発現誘導することにより、細胞内 GSH 量を増加させることが示唆された。



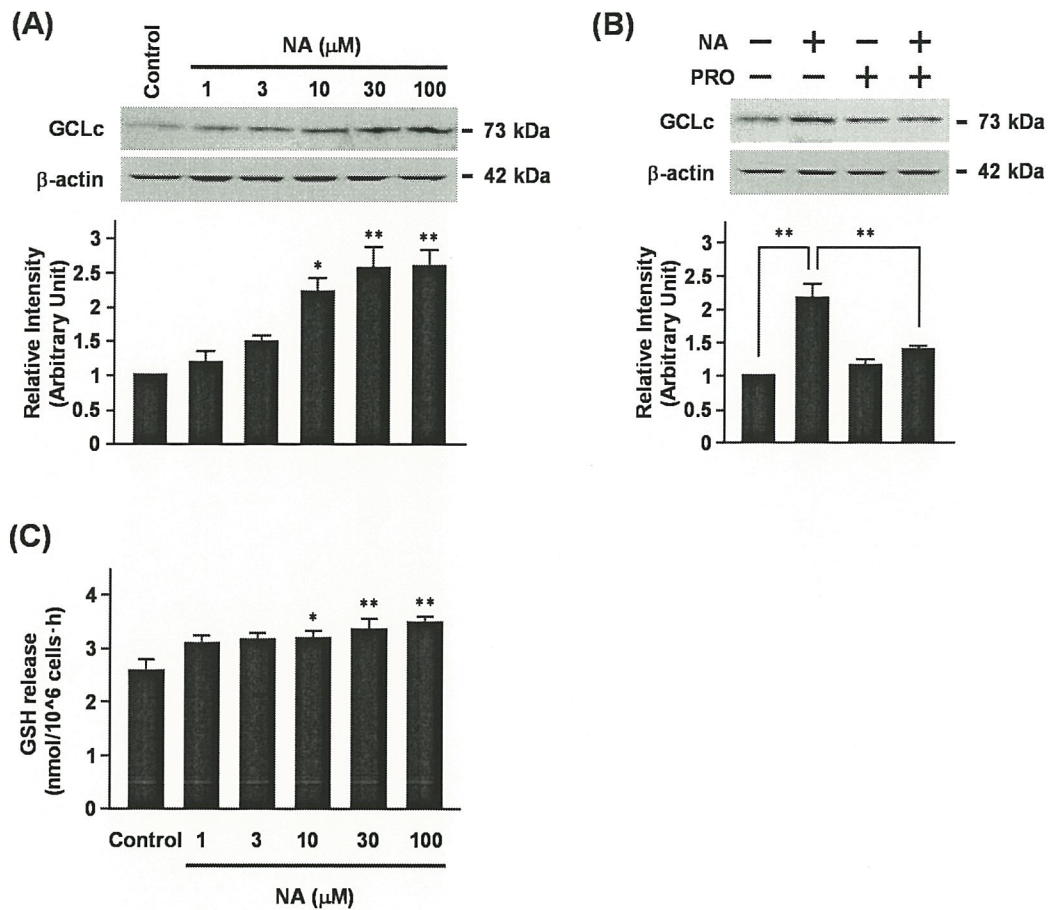


Figure 3. Noradrenaline induces GCLc proteins via  $\beta$ -adrenoceptor stimulation in U-251 MG cells. (A, B) U-251 MG cells were treated for 24 h with noradrenaline (NA) at the indicated concentrations (A) or with 10  $\mu$ M NA in the absence or presence of 50  $\mu$ M propranolol (PRO; B). The level of GCLc protein was determined by Western blotting.  $\beta$ -Actin was used as a sample-loading control. Relative intensity of the bands, as quantified by densitometry, is shown below the protein bands. The level of GCLc protein was expressed as relative intensity compared with that of the control (arbitrarily set as "1.0"). (C) U-251 MG cells were treated with NA at the indicated concentrations for 24 h. Then the culture medium was replaced with a minimal medium, and the cells were then incubated for 3 h. Thereafter the amount of GSH released into the minimal medium was determined as described in Methods. Results show representative blots of 3-4 independent experiments (A) and the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 3-4 independent experiments (B, C). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, significantly different from the Control, or significant difference between bracketed values.

### 1.3 U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる GSH 産生誘導への $\beta_3$ 受容体の関与

U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる細胞内 GSH 量の増加に関与する  $\beta$  受容体サブタイプを明らかにする目的で、 $\beta$  受容体選択的遮断薬及び作用薬の影響について検討した。

ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) による細胞内 GSH 量の増加は、 $\beta_1$  受容体選択的遮断薬 atenolol (30  $\mu$ M) 及び  $\beta_2$  受容体選択的遮断薬 butoxamine (30  $\mu$ M) により阻害されなかったが、 $\beta_3$  受容体選択的遮断薬 SR59230A (30  $\mu$ M) により有意に阻害された (Fig. 4A)。また、ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) による GCLc の発現量の増加は、atenolol (30  $\mu$ M) 及び butoxamine (30  $\mu$ M) により阻害されなかったが、SR59230A (30  $\mu$ M) により有意に阻害された (Fig. 4B)。さらに、 $\beta_1$  受容体選択的作用薬 denopamine (10  $\mu$ M) 及び  $\beta_2$  受容体選択的作用薬 salbutamol (10  $\mu$ M) は細胞内 GSH 量に影響を与えなかったが、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬 CL316243 (2  $\mu$ M) は細胞内 GSH 量を有意に増加させた (Fig. 4C)。

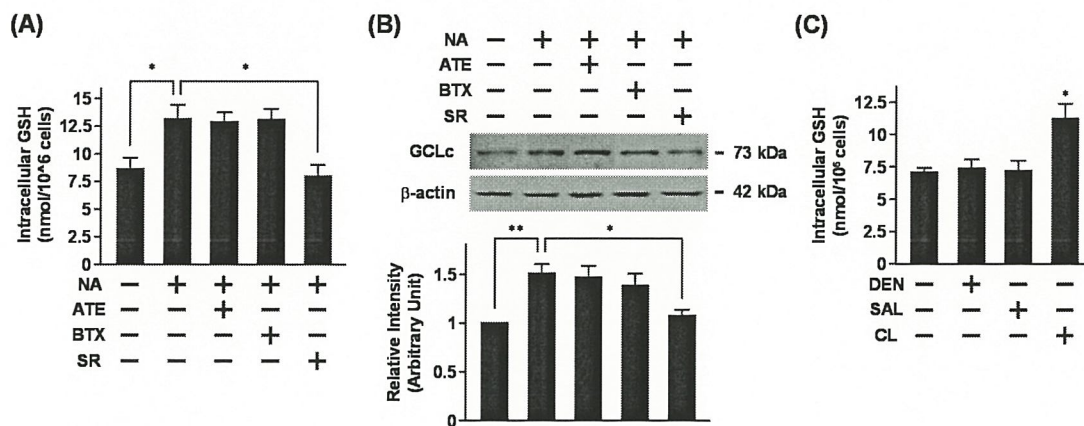


Figure 4. Noradrenaline increases intracellular GSH concentration via stimulation of  $\beta_3$ -adrenoceptors in U-251 MG cells.

(A, B) U-251 MG cells were treated for 24 h with 10  $\mu$ M noradrenaline (NA) in the absence or presence of 30  $\mu$ M atenolol (ATE), 30  $\mu$ M butoxamine (BTX) or 30  $\mu$ M SR59230A (SR). (A) The intracellular concentration of GSH was determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  s.e. obtained from 4 independent experiments. \* $P$  < 0.05 (B) The level of GCLc protein was determined by Western blotting.  $\beta$ -Actin was used as a sample-loading control. Relative intensity of the bands, quantified by densitometry, is shown below the protein bands. The level of GCLc was expressed as relative intensity compared with that of the control (arbitrarily set as "1.0"). Results show representative blots of 4 independent experiments and the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 (C) U-251 MG cells were treated with 10  $\mu$ M denopamine (DEN), 10  $\mu$ M salbutamol (SAL) or 2  $\mu$ M CL316243 (CL) for 24 h. The intracellular concentration of GSH was determined as described in Material and Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 vs. Control.

次に、U-251 MG 細胞における  $\beta$  受容体サブタイプの mRNA 発現について RT-PCR 法により検討した。その結果、U-251 MG 細胞には、 $\beta_1$ 、 $\beta_2$  及び  $\beta_3$  のすべての  $\beta$  受容体 mRNA が発現していることが明らかになった (Fig. 5A)。また、 $\beta_3$  受容体蛋白質の発現について Western blot 法により検討した結果、U-251 MG 細胞及びマウス初代培養アストロサイトに、 $\beta_3$  受容体蛋白質が発現していることが明らかになった (Fig. 5B)。

これらの結果より、U-251 MG 細胞においてノルアドレナリンは、 $\beta_3$  受容体を介して GCL を発現誘導することにより、細胞内 GSH 量を増加させることが示唆された。

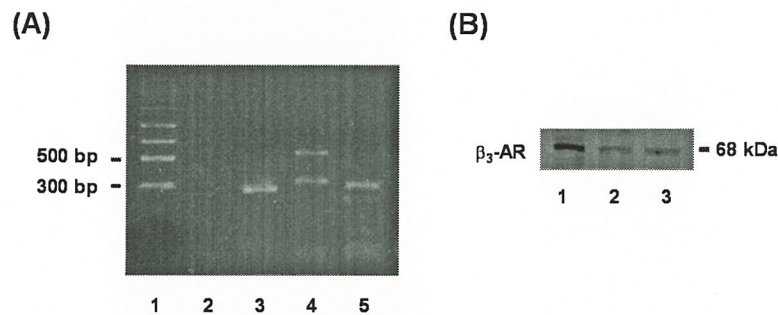


Figure 5. The expression of  $\beta$ -adrenoceptor subtypes in U-251 MG cells.

(A) The mRNA expressions of  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - and  $\beta_3$ -adrenoceptors in U-251 MG cells were examined by RT-PCR analysis. Results show representative results of 4 independent experiments. Lanes 1-5: DNA ladder marker, blank,  $\beta_1$  (265 bp),  $\beta_2$  (329 bp), and  $\beta_3$  (314 bp). (B) The protein expression of  $\beta_3$ -adrenoceptor ( $\beta_3$ -AR) in U-251 MG cells (lane 1) and mouse astrocytes in primary culture (lane 2) was examined by Western blotting. Results are representative of 4 independent experiments. Mouse brain lysate was used as a positive control (lane 3).



#### 1.4 U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる GSH 産生誘導への MAPK 系の関与

$\beta_3$  受容体は 7 回膜貫通型の G 蛋白質共役型受容体であり、Gs 蛋白質を介してアデニル酸シクラーゼ-cAMP 系と共役していることが知られている<sup>45-47)</sup>。U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる細胞内 GSH 量の増加へのアデニル酸シクラーゼ-cAMP 系の関与を明らかにする目的で、U-251 MG 細胞の細胞内 GSH 量に対する膜透過性 cAMP アナログ DBcAMP 及びアデニル酸シクラーゼを直接活性化する forskolin の影響について検討した。

DBcAMP (1 mM) 及び forskolin (3  $\mu$ M) の 24 時間処置は、U-251 MG 細胞の細胞内 GSH 量に影響を与えなかった (Fig. 6A)。

ERK や JNK などの mitogen-activated protein kinase (MAPK) は、ヒト臍帯静脈内皮細胞やヒト気管支上皮細胞株 HBE1 細胞において GSH の産生誘導に関わることが知られている<sup>48, 49)</sup>。そこで、U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる細胞内 GSH 量の増加への ERK 及び JNK の関与を明らかにする目的で、ERK を活性化する MAPK/ERK Kinase 1 (MEK1) 阻害薬 PD98059 及び JNK 阻害薬 SP600125 の影響について検討した。

PD98059 (50  $\mu$ M) は、ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) による細胞内 GSH 量の増加をほぼ完全に阻害した (Fig. 6B)。また、SP600125 (20  $\mu$ M) は、単独で細胞内 GSH 量を減少させたが、ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) による細胞内 GSH 量の増加をほぼ完全に阻害した (Fig. 6C)。

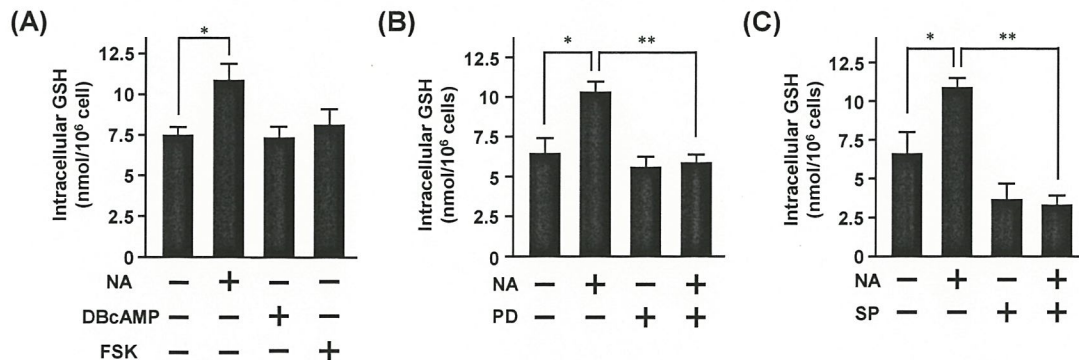


Figure 6. Noradrenaline increases intracellular GSH concentration of U-251 cells via ERK and JNK pathway, but not via a cAMP-dependent pathway.

(A) U-251 MG cells were treated with 10  $\mu$ M noradrenaline (NA), 1 mM DBcAMP or 3  $\mu$ M forskolin (FSK) for 24 h. The intracellular concentration of GSH was determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P$  < 0.05 (B, C) U-251 MG cells were treated for 24 h with 10  $\mu$ M NA in the absence or presence of 50  $\mu$ M PD98059 (PD; B) or 20  $\mu$ M SP600125 (SP; C). The intracellular concentration of GSH was determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01

次に、U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる ERK 及び JNK の活性化について、抗リン酸化 ERK 抗体及び抗リン酸化 JNK 抗体を用いて Western blot 法により検討した。ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) の処置により、処置 30 分後をピークとしてリン酸化 ERK 量及びリン酸化 JNK 量は増加し、それらのリン酸化量の増加は、処置 12 時間後まで持続していた (data not shown)。また、ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) によるリン酸化 ERK 量及びリン酸化 JNK 量の増加は、SR 59230A (30  $\mu$ M) によりほぼ完全に阻害された (Fig. 7)。

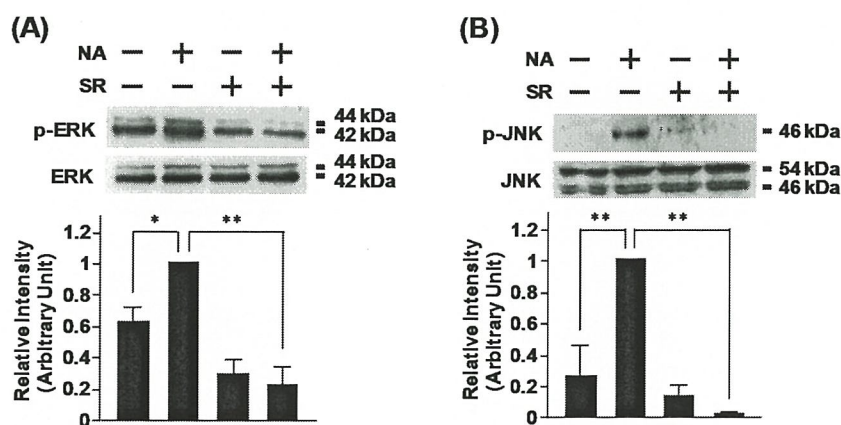


Figure 7 Noradrenaline activates ERK and JNK by stimulating  $\beta_3$ -adrenoceptors in U-251 MG cells.

U-251 MG cells were treated for 30 min with 10  $\mu$ M noradrenaline (NA) in the absence or presence of 30  $\mu$ M SR59230A (SR). Then the cells were harvested, and the levels of phosphorylated ERK (A) and JNK (B) were determined by Western blotting. Relative intensities of phospho-ERK and phospho-JNK, quantified by densitometry, are shown below the protein bands. The levels of phospho-ERK and phospho-JNK were expressed as relative intensity compared with the density of the band of the noradrenaline-treated sample (arbitrarily set as "1.0"). Results are representative of 4 independent experiments and the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01

次に、U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる GSH 量、リン酸化 ERK 量及びリン酸化 JNK 量の増加に対する Gi/o 型 G 蛋白質を不活化する PTX の影響について検討した。

ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) による細胞内 GSH の増加は、PTX (100 ng/mL) の存在下で有意に抑制された (Fig. 8A)。また、ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) によるリン酸化 ERK 量及びリン酸化 JNK 量の増加も、PTX (100 ng/mL) の存在下で有意に抑制された (Fig. 8B, 8C)。

これらの結果から、U-251 MG 細胞において、ノルアドレナリンによる  $\beta_3$  受容体を介した GSH の産生誘導には、Gi/o 型 G 蛋白質を介した ERK 及び JNK の活性化が関与することが示唆された。

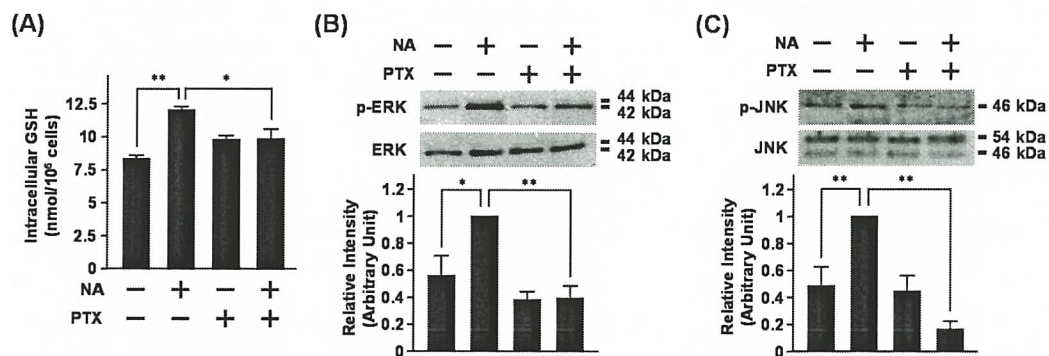


Figure 8. Effects of PTX on the increase in intracellular GSH and the activation of ERK and JNK by noradrenaline in U-251 MG cells.

U-251 MG cells were treated for 24 h (A) or 30 min (B and C) with 10  $\mu$ M noradrenaline (NA) in the absence or presence of 100 ng/ml PTX. (A) The intracellular concentration of GSH was determined as described in Material and Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 (B, C) The cells were harvested, and the levels of phosphorylated ERK (B) and JNK (C) were determined by Western blotting. Relative intensities of phospho-ERK and phospho-JNK were quantified by densitometry, and the levels of phospho-ERK and phospho-JNK were expressed as relative intensity compared with the density of the band of the noradrenaline-treated sample (arbitrarily set as "1.0"). Results are representative of 4 independent experiments and the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01



### 1.5 マウス初代培養アストロサイトの細胞内 GSH 量に対するノルアドレナリンの影響

マウス初代培養アストロサイトにおいて、ノルアドレナリンにより GSH の産生誘導がみられるか否かを明らかにする目的で、細胞内 GSH 量へのノルアドレナリンの影響を検討した。

ノルアドレナリン (1-30  $\mu\text{M}$ ) の 24 時間処置は、その濃度依存的にマウス初代培養アストロサイトの細胞内 GSH 量を増加させた (Fig. 9A)。また、ノルアドレナリン (1-30  $\mu\text{M}$ ) は、濃度依存的にマウス初代培養アストロサイトの GCLc の発現量を増加させた (Fig. 9B)。

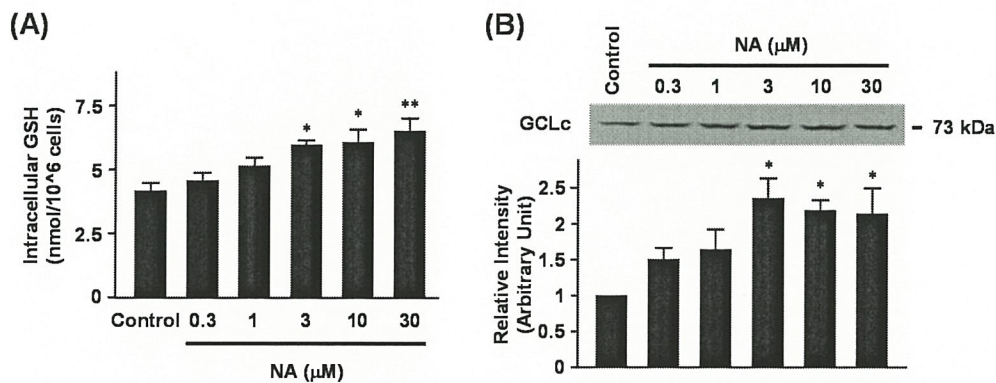


Figure 9. Noradrenaline increases the levels of intracellular GSH and GCL protein in mouse astrocytes in primary culture.

(A, B) Primary culture of mouse astrocytes were treated with noradrenaline (NA) at the indicated concentrations for 24 h. (A) Intracellular GSH concentrations were determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 3-4 independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Control. (B) The level of GCLc protein was determined by Western blotting. Relative intensity of the bands, quantified by densitometry, is shown below the protein bands. The level of GCLc protein was expressed as relative intensity compared with that of the Control (arbitrarily set as "1.0"). Results show blots representative of 4 independent experiments and the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P < 0.05$  vs. Control.

次に、マウス初代培養アストロサイトにおけるノルアドレナリンによる細胞内 GSH 量の増加へのアドレナリン受容体の関与を明らかにする目的で、アドレナリン受容体作用薬及び遮断薬の影響について検討した。

マウス初代培養アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) の 24 時間処置による細胞内 GSH 量の増加は、phenoxybenzamine (10  $\mu$ M) により阻害されなかったが、propranolol (10  $\mu$ M) により有意に阻害された (Fig. 10)。

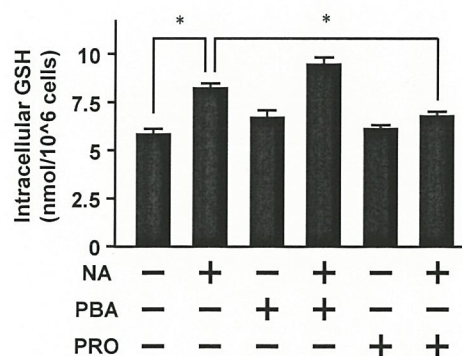


Figure 10. Effects of phenoxybenzamine and propranolol on the noradrenalin-induced increase in intracellular GSH in mouse astrocytes in primary culture.

Mouse astrocytes in primary culture were treated for 24 h with 10  $\mu$ M NA in the absence or presence of 10  $\mu$ M phenoxybenzamine (PBA) or 10  $\mu$ M propranolol (PRO). The intracellular concentration of GSH was determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \*\* $P < 0.01$

また、マウス初代培養アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) による細胞内 GSH 量の増加は、atenolol (10  $\mu$ M) 及び butoxamine (10  $\mu$ M) により阻害されなかったが (Fig. 11A, B)、SR 59230A (10  $\mu$ M) により有意に阻害された (Fig. 11C)。さらに、CL 316243 (2  $\mu$ M) の 24 時間処置は、細胞内 GSH 量を有意に増加させた (Fig. 11D)。

次に、マウス初代培養アストロサイトにおけるノルアドレナリンによる GCLc の発現誘導への  $\beta_3$  受容体の関与を明らかにする目的で、SR59230A の影響について検討した。

ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) による GCLc の発現量の増加は、SR59230A (10  $\mu$ M) により有意に阻害された (Fig. 12)。

これらの結果より、マウス初代培養アストロサイトにおいてノルアドレナリンは  $\beta_3$  受容体を介して GCLc を発現誘導することにより、細胞内 GSH 量を増加することが示唆された。

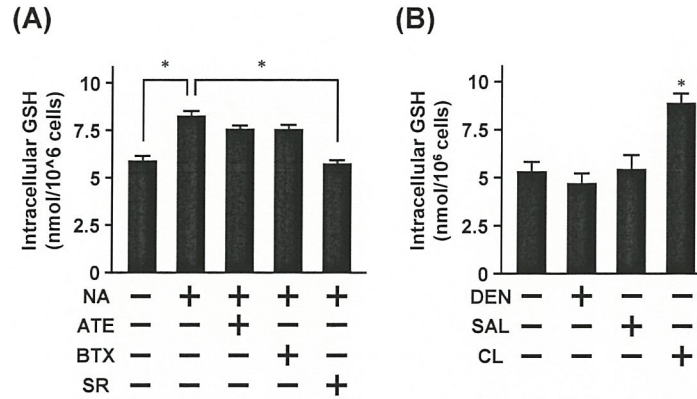


Figure 11. Noradrenaline increases the intracellular GSH concentration via stimulation of  $\beta_3$ -adrenoceptors in mouse astrocytes in primary culture.

(A) Primary culture of mouse astrocytes were treated for 24 h with 10  $\mu$ M NA in the absence or presence of 10  $\mu$ M atenolol (ATE), 10  $\mu$ M butoxamine (BTX) or 10  $\mu$ M SR59230A (SR). (B) The astrocytes were treated with 10  $\mu$ M denopamine (DEN), 10  $\mu$ M salbutamol (SAL) or 2  $\mu$ M CL316243 (CL) for 24 h. Intracellular GSH concentrations were determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 3-4 independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, significantly different from the Control, or significant difference between bracketed values.

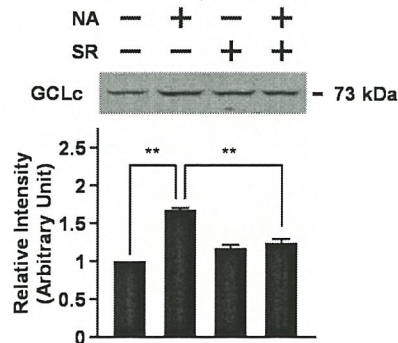


Figure 12. NA increases the level of GCL protein via  $\beta_3$ -adrenoceptor stimulation in mouse astrocytes in primary culture.

Mouse astrocytes in primary culture were treated for 24 h with 10  $\mu$ M NA in the absence or presence of 10  $\mu$ M SR59230A (SR). The level of GCL protein was determined by Western blotting. Relative intensity of the bands, quantified by densitometry, is shown below the protein bands. The level of GCL protein was expressed as relative intensity compared with that of the control (arbitrarily set as "1.0"). Results show blots representative of 4 independent experiments and the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \*\* $P$  < 0.01



## 考 察

$\beta_3$  受容体は、7 回膜貫通型の G 蛋白質共役受容体であり、Gs 蛋白質と共役することによりアデニル酸シクラーゼ-cAMP 系を活性化することが報告されている<sup>45-47)</sup>。また、マウス褐色脂肪細胞において、 $\beta_3$  受容体を刺激することにより、cAMP 系を介してグルコース取り込み能が促進されることが報告されている<sup>50)</sup>。一方、マウス前駆脂肪細胞株 C3H10T1/2 細胞において、 $\beta_3$  受容体は、Gi 蛋白質と共役することにより ERK などの MAPK を活性化することが報告されている<sup>51)</sup>。本研究において、膜透過性 cAMP アナログ DBcAMP 及びアデニル酸シクラーゼを直接活性化する forskolin は、U-251 MG 細胞の細胞内 GSH 量に影響を与えなかった (Fig. 6A)。一方、Gi/o 型 G 蛋白質を不活化する PTX は、ノルアドレナリンによる U-251 MG 細胞の細胞内 GSH 量の増加を阻害した (Fig. 8A)。これらの結果から、U-251 MG 細胞において、 $\beta_3$  受容体の刺激は、Gi/o 蛋白質を介して細胞内 GSH 量を増加させることが示唆された。

本研究において、ERK を活性化する MEK1 の阻害薬 PD98059 及び JNK 阻害薬 SP600125 は、U-251 MG 細胞でのノルアドレナリンによる細胞内 GSH 量の増加を阻害した (Fig. 6B, 6C)。また、U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる ERK 及び JNK の活性化は、 $\beta_3$  受容体選択的遮断薬 SR 59230A により有意に阻害された (Fig. 7)。これらの結果は、U-251 細胞でのノルアドレナリンによる  $\beta_3$  受容体を介した GSH の産生誘導には、ERK 及び JNK の両キナーゼの活性化が必要であることを示唆している。ノルアドレナリンは、 $\alpha_1$  受容体を遺伝子導入したラットクロム親和性 PC12 細胞において、 $\alpha_1$  受容体を介して JNK を活性化すること<sup>52)</sup>、 $\beta_2$  受容体を過剰発現したヒト胎児腎細胞由来 HEK-293 細胞において、 $\beta_2$  受容体を介して ERK を活性化すること<sup>53)</sup>、ヒトニューロblastoma SH-SY5Y 細胞において、 $\alpha_2$  受容体を介して ERK 及び JNK を活性化すること<sup>54)</sup>、ラット脊髄由来アストロサイトにおいて、 $\alpha_1$  受容体及び  $\beta_2$  受容体を介して ERK 及び JNK を活性化することが報告されている<sup>55)</sup>。一方、本研究において、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬 CL316243 は、U-251 MG 細胞の細胞内 GSH 量を増加させたが、 $\alpha_1$  受容体作用薬 phenylephrine、 $\alpha_2$  受容体作用薬 clonidine 及び  $\beta_2$  受容体選択的作用薬 salbutamol は、U-251 MG 細胞の細胞内 GSH 量に影響を与えなかった (Fig. 2B, 4C)。これらの結果は、U-251 MG 細胞の GSH の産生誘導が、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$  及び  $\beta_2$  受容体の刺激ではみられず、 $\beta_3$  受容体の刺激のみでみられることを示している。これらの本研究での結果と過去の報告との相違は、細胞種の違い、細胞ごとのアドレナリン受容体サブタイプの発現の違い、あるいはアドレナリン受容体サブタイプごとの脱感作の違いに起因している可能性が考えられた。このことに関連して、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$  及び  $\beta_2$  受容体は、ノルアドレナリン刺激により、internalization や G 蛋白質の脱共役、受容体の発現低下により数分から数時間で脱感作するが<sup>56-60)</sup>、 $\beta_3$  受容体はそれらの機構による脱感作を起こさないことが報告されている<sup>61,62)</sup>。また、本研究において、U-251 MG 細胞でのノルアドレナリンによる GSH の産生誘導には、12 時間以上の処置時間が必要であることを明ら

かにしている (Fig. 1B)。これらのことから、U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる GSH の産生誘導には、 $\beta_3$  受容体を介した持続的な細胞内シグナル伝達系の活性化が必要である可能性が考えられた。

GCL は GSH 合成の律速酵素として知られている<sup>31)</sup>。本研究において、ノルアドレナリンは、U-251 MG 細胞及びマウス初代培養アストロサイトの GCLc 蛋白質の発現量及び細胞内 GSH 量を増加させた (Fig. 1, 3A, 9)。また、これらのノルアドレナリンの作用は、 $\beta_3$  受容体遮断薬 SR59230A により阻害された (Fig. 4A, 4B, 11A, 12)。さらに、U-251 MG 細胞において、ノルアドレナリンは、細胞外への GSH の放出量を増加させた (Fig. 3C)。これらの結果は、アストロサイトにおいて、ノルアドレナリンは、 $\beta_3$  受容体を介して GCLc 蛋白質を発現誘導することにより、細胞内 GSH 量を増加することを示唆している。また、本研究において、ノルアドレナリンは U-251 MG 細胞の GCLc mRNA 量を増加させた (data not shown)。これらのことから、ノルアドレナリンは、GCLc を転写誘導することにより、GCLc 蛋白質量を増加させることが示唆された。GCLc の転写は、nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2)、activator protein 1 (AP-1)、nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) などの転写因子により調節されることが報告されている<sup>63-65)</sup>。本研究において、ノルアドレナリンは、転写活性を有する NF- $\kappa$ B のサブユニットである p65 及び Nrf2 の U251 MG 細胞の核内での量に影響を与えなかった (data not shown)。このことから、これらの転写因子は、ノルアドレナリンによる GCLc の発現誘導には関与しないことが示唆される。このことは、ノルアドレナリンが、ラット初代培養アストロサイトにおいて、NF- $\kappa$ B の核内移行を阻害する I $\kappa$ B $\alpha$  の発現量を増加させること、ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞において、アミロイド $\beta_{1-42}$  による Nrf2 の活性化に影響を与えないことから支持される<sup>66, 67)</sup>。ERK と JNK は AP-1 の転写活性を調節することが報告されている<sup>68, 69)</sup>。本研究において、MEK1 を阻害し ERK の活性化を阻害する PD98059 及び JNK 阻害薬 SP600125 は、ノルアドレナリンによる細胞内 GSH 量の増加を阻害した (Fig. 6B, 6C)。GCLc の転写誘導の詳細な機構は今後の検討課題ではあるが、これらのことから、U-251 MG 細胞でのノルアドレナリンによる GCLc の発現誘導には、AP-1 を介した転写誘導が関与する可能性が考えられた。

アストロサイトは GSH を放出することにより神経細胞にシステインを供給し、神経細胞の GSH 合成を促進することが報告されている<sup>35, 36)</sup>。また、ラット大脳皮質由来神経細胞やラット初代培養ドパミン神経細胞において、アストロサイトと共培養することにより、アストロサイトからの GSH 供給を介して、ROS による酸化的ストレス誘発細胞死が抑制されることが報告されている<sup>70, 71)</sup>。本研究において、ノルアドレナリンは、U-251 MG 細胞及びマウス初代培養アストロサイトの細胞内 GSH 量を増加させた (Fig. 1, 9)。また、ノルアドレナリンは U-251 MG 細胞から細胞外への GSH 放出を増加させた (Fig. 3C)。これらのことから、ノルアドレナリンは、アストロサイトの GSH 産生とその細胞外への放出を増加させ、神経細胞にシステインを供給することで、神経細胞を酸化的ストレス誘発細胞死から保護することが示唆された。

第二章では、ノルアドレナリンの神経保護作用について、U-251 MG 細胞とヒトニューロblastoma SH-SY5Y 細胞の共培養系及び初代培養神経細胞とアストロサイトの共培養系を用いて検討を行った。



## 第二章 ノルアドレナリンによるアストロサイトを介した神経保護作用

$\text{H}_2\text{O}_2$  は、生体内においてエネルギー代謝の過程で細胞内で発生し、酸化ストレスを引き起こす ROS の一つである。他の ROS と比較して、 $\text{H}_2\text{O}_2$  自体の酸化力は弱い、半減期が長く、容易に細胞膜を通過する。また、 $\text{H}_2\text{O}_2$  は、細胞内の鉄イオンなどの遷移金属イオンとのフェントン反応により極めて酸化力の強いヒドロキシラジカルとなり、細胞傷害作用を示す。 $\text{H}_2\text{O}_2$  は、グルタチオンペルオキシダーゼにより GSH 依存的に  $\text{H}_2\text{O}$  へと代謝され、無毒化される。ラット大脳皮質由来初代培養神経細胞やマウス海馬由来初代培養神経細胞において、GSH 合成を阻害する薬物等で細胞内 GSH 量を減少させることにより、 $\text{H}_2\text{O}_2$  による酸化ストレスに対して脆弱になることが報告されている<sup>72,73)</sup>。これらのことから、GSH は  $\text{H}_2\text{O}_2$  による酸化ストレスに対する神経細胞の防御系において、非常に重要な役割を果たしていると考えられる。

アストロサイトによる細胞外への GSH の放出には、薬剤排出蛋白質として知られている multidrug resistance protein 1 (MRP1) が関与することが報告されている<sup>74)</sup>。MRP1 は ATP-binding cassette (ABC) トランスポータースーパーファミリーに属するトランスポーターであり、ATP 依存的に有機イオンを細胞外に排出するポンプとして働く<sup>75)</sup>。神経細胞はシスチン取り込み能が乏しく、その GSH 合成は、アストロサイトからの GSH 放出によるシステイン供給に依存しているため<sup>35,36,76)</sup>、アストロサイトの MRP1 を介した GSH の放出は、隣接する神経細胞の細胞内 GSH 量の維持や酸化ストレスからの神経細胞の保護に非常に重要な役割を果たしていると考えられている。

本研究において、第一章で、ノルアドレナリンが、U-251 MG 細胞及びマウス初代培養アストロサイトの細胞内 GSH 量を増加させること、U-251 MG 細胞から細胞外への GSH 放出を増加させることを示した。これらのことから、ノルアドレナリンは、アストロサイトの GSH 産生とその神経細胞への供給を増加させ、神経細胞を酸化ストレス誘発細胞死から保護することが示唆される。

本章では、 $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発神経細胞死に対するノルアドレナリンの神経保護作用について、U-251 MG 細胞とヒトニューロblastoma SH-SY5Y 細胞の混合培養系及び初代培養神経細胞とアストロサイトの混合培養系を用いて検討を行った。

## 実験方法

### 1) 薬物および細胞および抗体

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) は Nacalai Tesque より購入した。DL-buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO)、monochlorobimane (MCB)、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体は Sigma より購入した。抗 Neuronal Nuclei (NeuN) 抗体は Merck Millipore Corp. (Darmstadt, Germany) より購入した。MK571 は Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) より購入した。Acivicin は Enzo Life Sciences (Plymouth Meeting, PA, USA) より購入した。pGFP-C1 vector は Clontech Laboratories Inc (Palo Alto, CA, USA) より購入した。Fugene 6 は Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA) より購入した。Alexa Fluor 568 標識抗ウサギ IgG 抗体は Invitrogen より購入した。Neurobasal medium, B27 Supplement Minus AO は ThermoFisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA) より購入した。FITC 標識抗マウス IgG 抗体は Cappel (Durham, NC, USA) より購入した。抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A) より購入した。その他の試薬は、WAKO Pure Chemicals より購入した。

### 2) SH-SY5Y 細胞の培養、調製及び GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の作製

SH-SY5Y 細胞は、10% FBS/DMEM 中にて 5% CO<sub>2</sub>/95% air、37°C で培養した。細胞生存率の測定には、 $2 \times 10^4$  cells/well の密度で 96 well plate に播種した。GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の作製には、 $1 \times 10^5$  cells/well の密度で 24 well plate に播種した。

GFP の導入は、細胞播種 24 時間後に、Fugene 6 を用いて、pGFP-C1 vector を Roche 社の推奨方法に従いトランスフェクションした。0.5  $\mu$ g の pGFP-C1 vector と 1.5  $\mu$ L の Fugene 6 を 100  $\mu$ L の血清フリーの DMEM 中で混合し、室温で 5 分間インキュベートした。その溶液を培養上清に添加することにより pGFP-C1 vector を SH-SY5Y 細胞に導入した。導入 4 時間後に、培養上清を 10% FBS/DMEM に置換し、さらに培養した。導入 24 時間後に、培養上清を 600  $\mu$ g/mL G418 を含む DMEM (G418 含有 DMEM) に置換し、遺伝子導入細胞の選択を行った。48 時間ごとに、G418 含有 DMEM で培養液を置換し、1 週間培養した。その後、シングルコロニーを単離、培養し実験に用いた。

### 3) U-251 MG 細胞の培養及び調製

U-251 MG 細胞の培養は、第一章の方法に準じて行った。

#### 4) U-251 MG 細胞と GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の混合培養系の調製及び薬物処置

U-251 MG 細胞と GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の混合培養は、U-251 MG 細胞の播種 24 時間後に、U-251 MG 細胞の培養上清を除去し、GFP 導入 SH-SY5Y 細胞を U-251 MG 細胞上に播種することにより調製した。また、siRNA 導入の検討では、U-251 MG 細胞への 2 回目の SiRNA 導入 24 時間後に GFP 導入 SH-SY5Y 細胞を播種した。GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の細胞生存率の測定には、U-251 MG 細胞と GFP 導入 SH-SY5Y 細胞をそれぞれ  $5 \times 10^4$  cells/well の密度で 24 well plate に播種した。また、GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の細胞内 GSH 量の測定には、U-251 MG 細胞と GFP 導入 SH-SY5Y 細胞をそれぞれ  $0.9 \times 10^4$  cells/well の密度で 96 well plate に播種した。

薬物処置は、GFP 導入 SH-SY5Y 細胞播種 24 時間後から開始し、第一章の方法に準じて行った。また、BSO、SR 59230A 及び MK571 は、ノルアドレナリン処置の 1 時間前から共存させた。

#### 5) 細胞生存率の測定

SH-SY5Y 細胞の単独培養系における細胞生存率の測定は MTT 法により行った。薬物処置後、培養上清に MTT を終濃度 0.5 mg/mL になるように添加し、37 °C で 1 時間 30 分インキュベートした。その後、培養上清を除去し、DMSO を加えて細胞を溶解し、吸光度 ( $\lambda = 570$  nm) を測定した。細胞生存率は無処置の細胞の吸光度を 100% として、% で表した。

U-251 MG 細胞と GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の混合培養系における GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の細胞生存率の測定は、蛍光顕微鏡により、視野（接眼レンズ、対物レンズ、各 10 倍）の GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の細胞数を計測し（3 視野以上、無処置細胞の合計数 300 以上）、無処置の混合培養系での GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の細胞数を 100% として、% で表した。

マウス初代培養神経細胞の培養系及びマウス初代培養神経細胞とアストロサイトの混合培養系における神経細胞の細胞生存率は、間接蛍光抗体法による免疫細胞染色で神経細胞マーカーの NeuN を染色した後、蛍光顕微鏡で視野（接眼レンズ 10 倍、対物レンズ 20 倍）の NeuN 陽性細胞数を計測し（3 視野以上、無処置細胞の合計数 200 以上）、無処置の培養系における NeuN 陽性細胞数を 100% として、% で表した。

マウス初代培養ドパミン神経細胞の培養系におけるドパミン神経細胞の細胞生存率は、間接蛍光抗体法による免疫細胞染色でドパミン神経細胞マーカーの TH を染色した後、蛍光顕微鏡で視野（接眼レンズ 10 倍、対物レンズ 20 倍）の TH 陽性細胞数を計測し（5 視野以上、無処置細胞の合計数 100 以上）、無処置の培養系における TH 陽性細胞数を 100% として、% で表した。

#### 6) マウス初代培養アストロサイトの調製

第一章の方法に準じてマウス初代培養アストロサイトを調製した。



#### 7) 細胞内 GSH 量の測定

U-251 MG 細胞、SH-SY5Y 細胞及びマウス初代培養アストロサイトの細胞内グルタチオン量は、第一章の方法に準じて測定した。

U-251 MG 細胞と GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の混合培養系における GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の細胞内 GSH 量は、Cellomics array scan (Thermo Scientific, San Jose, CA, U.S.A) を用いて測定した。薬物処置後、培養液に GSH と反応して青色蛍光を示す MCB を終濃度が 50  $\mu\text{M}$  となるように添加し、15 分間反応させた。Cellomics array scan で GFP 蛍光を示す範囲を設定し、その範囲における MCB の面積あたりの平均蛍光強度を測定した。GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の細胞内 GSH 量は、BSO (3 mM) を 24 時間処置した GFP 導入 SH-SY5Y 細胞での MCB の蛍光強度を background とし、無処置の GFP 導入 SH-SY5Y 細胞での MCB の蛍光強度を 100% とし、%で表した。

#### 8) マウス初代培養神経細胞の培養系の調製及び薬物処置

初代培養神経細胞は、胎生 14 日目の C57BL/6J マウス的大脑より調製した。摘出した大腦を裁断後、DMEM に懸濁し、20°C、110  $\times g$  で 5 分間遠心した。上清を除去後、沈殿した細胞を、0.25% Trypsin-EDTA 溶液に懸濁し、37°C で 5 分間インキュベートした。Trypsin-EDTA 溶液と同量の 10% FBS/DMEM を加え反応を停止させ後、20°C、110  $\times g$  で 5 分間遠心した。上清を除去後、沈殿した細胞を 2% B27 Supplement Minus AO、0.5 mM glutamine を含む Neurobasal medium 中にピペットマンを用いて分散した。分散した細胞を 24 well プレート中、polyethylenimine (PEI)でコーティングした 15 mm カバーガラス上に  $5 \times 10^5$  cells/well の密度で播種し、5% CO<sub>2</sub>/95% air、37°C で培養した。培養液は 48 時間ごとに、1/2 量を交換した。薬物は、2% B27 Supplement Minus AO、0.5 mM glutamine を含む Neurobasal medium に希釈し、処置した。ノルアドレナリンは、細胞播種 5 日目に、培養液をノルアドレナリンを含む培養液に置換し、24 時間処置した。また、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は、培養液を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む培養液に置換することにより処置した。

#### 9) マウス初代培養神経細胞とアストロサイトの混合培養系の調製及び薬物処置

初代培養神経細胞とアストロサイトの混合培養は、胎生 14 日目の C57BL/6J マウス的大脑より調製した。摘出した大腦を裁断後、DMEM に懸濁し、20°C、110  $\times g$  で 5 分間遠心した。上清を除去後、沈殿した細胞を、0.25% Trypsin-EDTA 溶液に懸濁し、37°C で 5 分間インキュベートした。Trypsin-EDTA 溶液と同量の 10% FBS/DMEM を加え反応を停止させ後、20°C、110  $\times g$  で 5 分間遠心した。上清を除去後、沈殿した細胞を 10% FBS/DMEM 中にピペットマンを用いて分散した。分散した細胞を 24 well プレート中、PEI でコーティングしたカバーガラス上に  $5 \times 10^5$  cells/well の密度で播種し、5% CO<sub>2</sub>/95% air、37°C で培養した。培養液は 48 時間ごとに、1/2 量を交換した。薬物は、2% B27 Supplement Minus AO、0.5 mM glutamine を含む Neurobasal medium に希釈し、処置した。ノルアドレナリン及び



CL316243 は、細胞播種 5 日目に、培養液をノルアドレナリン及び CL316243 を含む培養液に置換し、24 時間処置した。SR 59230A は、ノルアドレナリン処置の 1 時間前に培養液に添加し、ノルアドレナリンと共存させた。また、 $H_2O_2$  は、培養液を  $H_2O_2$  を含む培養液に置換することにより処置した。

10) マウス初代培養ドパミン神経細胞とアストロサイトの混合培養系の調製及び薬物処置

初代培養ドパミン神経細胞は、胎生 14 日目の C57BL/6J マウスの中脳より調製した。調製及び薬物処置は、上記のマウス初代培養神経細胞とアストロサイトの混合培養系の調製及び薬物処置と同様に行った。

11) 間接蛍光抗体法による免疫細胞染色

15 mm カバーガラス上で培養した細胞を、薬物処置後、PBS (－) で 2 回洗浄し、4% パラホルムアルデヒド溶液で固定した (室温、15 分間)。洗浄後、0.1% Triton-X 100 を含む Tris-buffered saline (TBS) で細胞を permeabilize した (室温、15 分間)。染色には、一次抗体として抗 NeuN 抗体 (1:100)、抗 GFAP 抗体 (1:50) あるいは抗 TH 抗体 (1:100) を用いた。また二次抗体として、Alexa Fluor 568 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:200) あるいは FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (1:200) を用いた。Hoechst 33342 (10  $\mu$ M) を用いて核の染色を行った後、カバーガラスをスライドガラス上にマウントし、蛍光顕微鏡により細胞を観察した。

12) データ解析

実験結果は、3-4 例の平均値  $\pm$  S.E.M.、あるいは、3-4 例の代表例として表した。有意差検定は ANOVA を行い、post-hoc test として Scheffe's test または Dunnett's test を行った。

## 実験結果

### 2.1 U-251 MG 細胞と SH-SY5Y 細胞の混合培養系におけるノルアドレナリンによる $H_2O_2$ 誘発神経細胞死抑制作用

ヒトニューロblastoma SH-SY5Y 細胞の単独培養系において、ノルアドレナリンが  $H_2O_2$  誘発細胞死を抑制するか否かを明らかにする目的で、SH-SY5Y 細胞の細胞生存率を MTT 法により検討した。

SH-SY5Y 細胞において、 $H_2O_2$  (50-500  $\mu M$ ) の 24 時間処置は、その濃度依存的に細胞死を誘導した (Fig. 13A)。ノルアドレナリン (1-100  $\mu M$ ) の 24 時間前処置は、いずれの濃度においてもその細胞死に影響を与えなかった (Fig. 13B)。

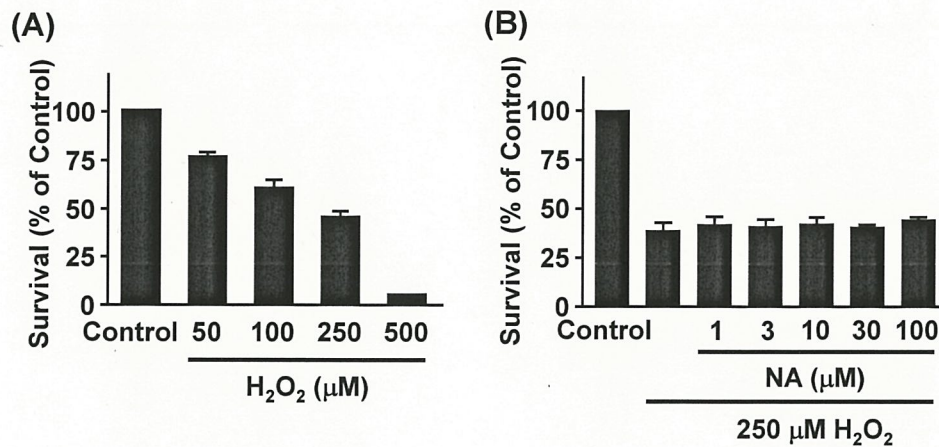


Figure 13. Effect of pretreatment with noradrenaline on  $H_2O_2$ -induced cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

(A) SH-SY5Y cells were treated with  $H_2O_2$  at the indicated concentrations for 24 h. (B) SH-SY5Y cells were treated with noradrenaline (NA) at the indicated concentrations for 24 h. Then the cells were treated with 250  $\mu M$   $H_2O_2$  for 24 h. The cell viability was determined by MTT assay. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments.

次に、ノルアドレナリンがアストロサイトを介して神経保護作用を示すか否かを明らかにする目的で、U-251MG 細胞と GFP 安定発現 SH-SY5Y 細胞の混合培養を行った。混合培養した細胞を蛍光顕微鏡で観察した結果、GFP の緑色蛍光を示す SH-SY5Y 細胞のみが観察された (Fig. 14)。この U-251 MG 細胞と SH-SY5Y 細胞の混合培養系を用いて、SH-SY5Y 細胞の  $H_2O_2$  誘発細胞死に対するノルアドレナリンの影響を検討した。



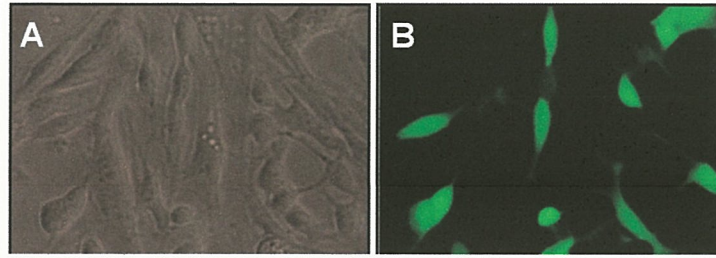


Figure 14. Co-culture of GFP-transfected SH-SY5Y cells and U-251 MG cells.

GFP-transfected SH-SY5Y cells were co-cultured with U-251 MG cells as a mixture. Phase contrast (A) and fluorescence (B) images of the co-cultured cells were taken using a fluorescence microscope.

混合培養系において、 $\text{H}_2\text{O}_2$  (250-750  $\mu\text{M}$ ) の 24 時間処置により、その濃度依存的に GFP 陽性細胞数の減少がみられ、SH-SY5Y 細胞に細胞死が誘導された (Fig. 15A)。この細胞死は、ノルアドレナリン (10、30  $\mu\text{M}$ ) を 24 時間前処置することにより、有意に抑制された (Fig. 15)。

これらの結果から、混合培養系において、ノルアドレナリンは U-251MG 細胞を介して SH-SY5Y 細胞の  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発細胞死を抑制することが示唆された。

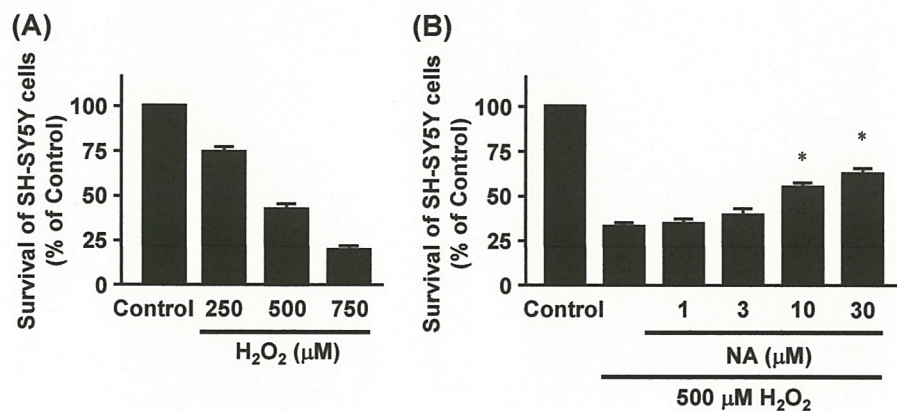


Figure 15. Effect of pretreatment with noradrenaline on  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced death of SH-SY5Y cells in mixed co-culture.

(A) The co-cultured cells were treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  at the indicated concentrations for 24 h. (B) The co-cultured cells were treated with noradrenaline (NA) at the indicated concentrations for 24 h. Then the cells were treated with 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. The cell viability of SH-SY5Y cells was determined by counting the GFP-positive cells. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P < 0.05$  vs. 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$

次に、U-251 MG 細胞と SH-SY5Y 細胞の混合培養系を用いて、ノルアドレナリンによる SH-SY5Y 細胞の  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発細胞死抑制作用への  $\beta_3$  受容体の関与について検討した。

混合培養系において、ノルアドレナリン (10  $\mu\text{M}$ ) 前処置による SH-SY5Y 細胞の  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発細胞死抑制作用は、 $\beta_3$  受容体選択的遮断薬である SR59230A (30  $\mu\text{M}$ ) の存在下でほぼ完全に阻害された (Fig. 16A)。また、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬である CL316243 (2  $\mu\text{M}$ ) の 24 時間前処置は、SH-SY5Y 細胞の  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発細胞死を有意に抑制した (Fig. 16B)。

これらの結果から、混合培養系において、ノルアドレナリンは U-251 MG 細胞の  $\beta_3$  受容体に作用することにより、SH-SY5Y 細胞の  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発細胞死を抑制することが示唆された。

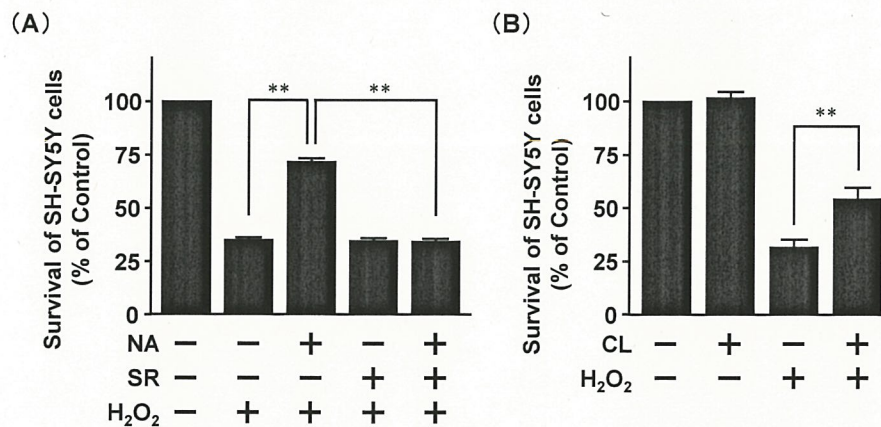


Figure 16. Involvement of  $\beta_3$ -adrenoceptor in the neuroprotective effect of noradrenaline in mixed co-culture.

(A) The co-cultured cells were treated for 24 h with 10  $\mu\text{M}$  noradrenaline (NA) in the absence or presence of 30  $\mu\text{M}$  SR59230A (SR). (B) The co-cultured cells were treated with 2  $\mu\text{M}$  CL316243 (CL) for 24 h. Then the cells were treated with 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. The cell viability of SH-SY5Y cells was determined by counting the GFP-positive cells. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 3-4 independent experiments. \*\* $P < 0.01$



次に、混合培養系でのノルアドレナリンによる SH-SY5Y 細胞の  $H_2O_2$  誘発細胞死抑制作用への GSH の関与を明らかにする目的で、U-251 MG 細胞の細胞内 GSH 量に対する GSH 合成阻害薬 BSO の影響について検討した。

U-251 MG 細胞において、BSO (3 mM) 処置により、細胞内 GSH 量は、無処置細胞の 5% 以下に減少した (Fig. 17A)。ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) による細胞内 GSH 量の増加は、BSO (3 mM) の存在下で完全に阻害された。

次に、混合培養系でのノルアドレナリンによる SH-SY5Y 細胞の  $H_2O_2$  誘発細胞死抑制作用への BSO の影響について検討した。

混合培養系において、BSO (3 mM) は SH-SY5Y 細胞の  $H_2O_2$  (500  $\mu$ M) による細胞死を有意に促進した。ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) 前処置による SH-SY5Y 細胞の  $H_2O_2$  誘発細胞死抑制作用は、BSO (3 mM) の存在下でほぼ完全に阻害された (Fig. 17B)。

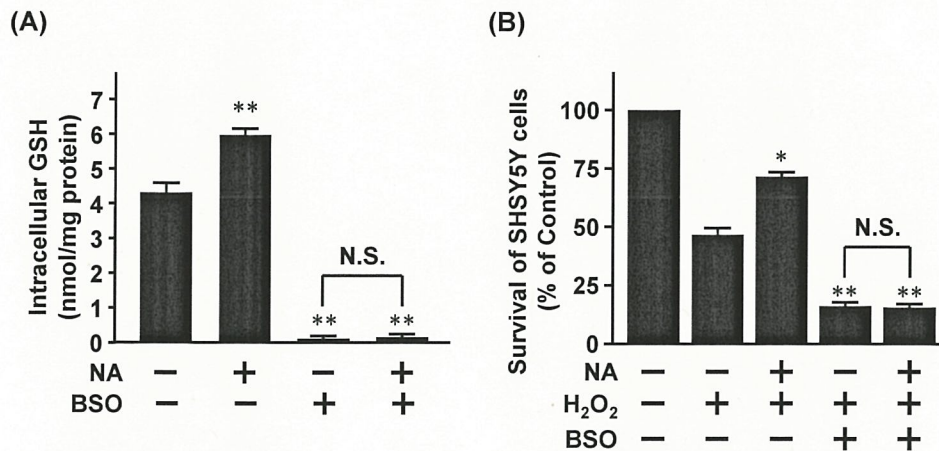


Figure17. Effects of BSO on the neuroprotective effect of noradrenaline in mixed co-culture.

(A) U-251 MG cells were treated for 24 h with 10  $\mu$ M noradrenaline (NA) in the absence or presence of 3 mM BSO. Intracellular GSH concentrations were determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \*\* $P$  < 0.01 vs. Control, N.S.: not significant

(B) The co-cultured cells were treated for 24 h with 10  $\mu$ M NA in the absence or presence of 3 mM BSO. Then the cells were treated with 500  $\mu$ M  $H_2O_2$  for 24 h. The cell viability of SH-SY5Y cells was determined by counting the GFP-positive cells. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 3-4 independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 vs. 500  $\mu$ M  $H_2O_2$ , N.S.; not significant

次に、混合培養系において、ノルアドレナリンが SH-SY5Y 細胞の細胞内 GSH 量を増加させるか否かを明らかにする目的で、GSH と反応して青色蛍光を示す MCB を用いて SH-SY5Y 細胞の細胞内 GSH 量を Cellomics Arrayscan により測定した。

混合培養系において、ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) を 24 時間処置することにより、SH-SY5Y 細胞の細胞内 GSH 量は有意に増加した (Fig. 18C)。この増加は  $\beta_3$  受容体選択的遮断薬である SR59230A (30  $\mu$ M) の存在下ではほぼ完全に阻害された。

これらの結果から、混合培養系において、ノルアドレナリンは、U-251 MG 細胞の  $\beta_3$  受容体を介して GSH 合成を促進し、SH-SY5Y 細胞へのシステイン供給を増加させることにより、SH-SY5Y 細胞の細胞内 GSH 量を増加させ、SH-SY5Y 細胞の  $H_2O_2$  誘発細胞死を抑制することが示唆された。

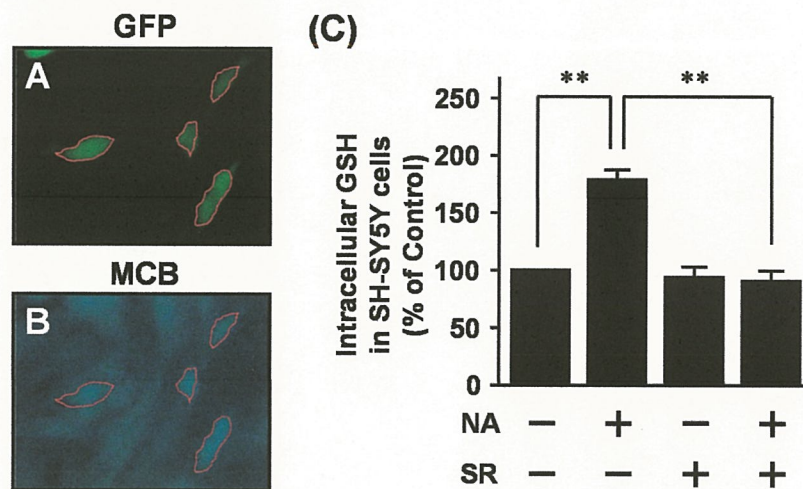


Figure 18. Noradrenaline increases intracellular GSH concentration of SH-SY5Y cells in mixed co-culture

The co-cultured cells were treated for 24 h with 10  $\mu$ M noradrenaline (NA) in the absence or presence of 30  $\mu$ M SR59230A (SR). Then the cells were incubated with 50  $\mu$ M MCB for 15 min. GFP (A) and MCB (B) fluorescence images of the co-cultured cells were taken using a fluorescence microscope. The GFP fluorescence area of the co-cultured cells was encircled by red line. (C) The intracellular concentration of GSH in SH-SY5Y cells was analyzed by Cellomics Arrayscan as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \*\* $P < 0.01$



アストロサイトは、薬剤排出蛋白質である MRP1 を介して、GSH を細胞外に放出することが知られている<sup>15)</sup>。混合培養系におけるノルアドレナリンによる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘発神経細胞死抑制作用への MRP1 の関与を明らかにする目的で、MRP1 阻害薬 MK571 の影響について検討した。

混合培養系において、ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) の 24 時間前処置による SH-SY5Y 細胞の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘発細胞死抑制作用は、MK571 (10  $\mu$ M) の存在下でほぼ完全に阻害された (Fig. 19A)。

次に、混合培養系におけるノルアドレナリンによる SH-SY5Y 細胞の細胞内 GSH 量の増加に対する MK571 の影響について検討した。

混合培養系において、ノルアドレナリン (10  $\mu$ M) の 24 時間処置による SH-SY5Y 細胞の細胞内 GSH 量の増加は、MK571 (10  $\mu$ M) の存在下でほぼ完全に阻害された (Fig. 19B)。

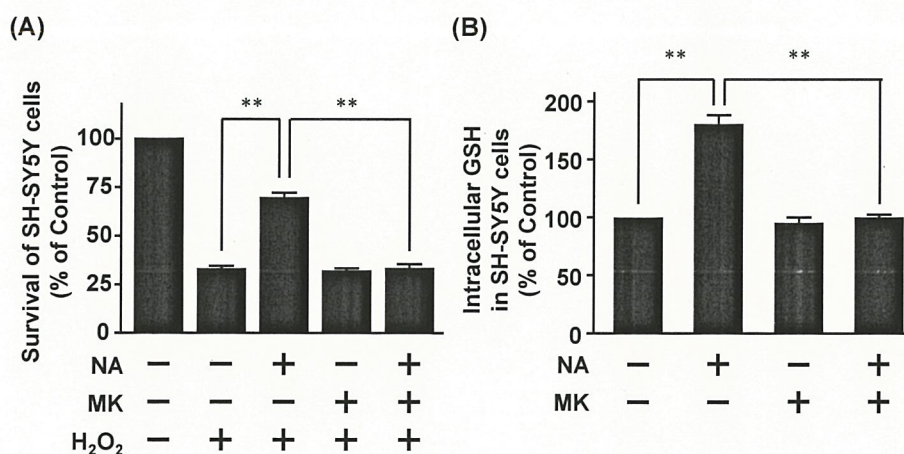


Figure 19. Effect of MK571 on the neuroprotection and the increase of intracellular GSH concentration of SH-SY5Y cells by noradrenaline in mixed co-culture.

(A) The co-cultured cells were treated for 24 h with 10  $\mu$ M noradrenaline (NA) in the absence or presence of 10  $\mu$ M MK571 (MK). Then the cells were treated with 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. The cell viability of SH-SY5Y cells was determined by counting the GFP-positive cells. (B) The co-cultured cells were treated for 24 h with 10  $\mu$ M NA in the absence or presence of 10  $\mu$ M MK. The intracellular concentration of GSH in SH-SY5Y cells was analyzed by Cellomics Arrayscan as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 3-4 independent experiments. \*\* $P$  < 0.01

アストロサイトから放出されたグルタチオンは、分解されてシステインとなり、神経細胞にとりこまれ GSH 合成に利用されることが報告されている<sup>35,36)</sup>。そこで次に、SH-SY5Y 細胞の細胞内グルタチオン量に対するシステインの影響について検討した。

SH-SY5Y 細胞に、システイン (0.03-1 mM) を 24 時間処置することにより、その濃度依存的に細胞内グルタチオン量は増加した (Fig. 20A)。

次に、SH-SY5Y 細胞における  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発細胞死に対するシステインの影響について検討した。

システイン (0.03-1 mM) を 24 時間前処置することにより、その濃度依存的に  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発細胞死は抑制された (Fig. 20B)。

これらの結果から、ノルアドレナリンは、U-251 MG 細胞の MRP1 を介して GSH の放出を増加させ、SH-SY5Y 細胞へのシステイン供給を増加させることにより、SH-SY5Y 細胞の細胞内 GSH 量を増加させ、SH-SY5Y 細胞の  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発細胞死を抑制することが示唆された。

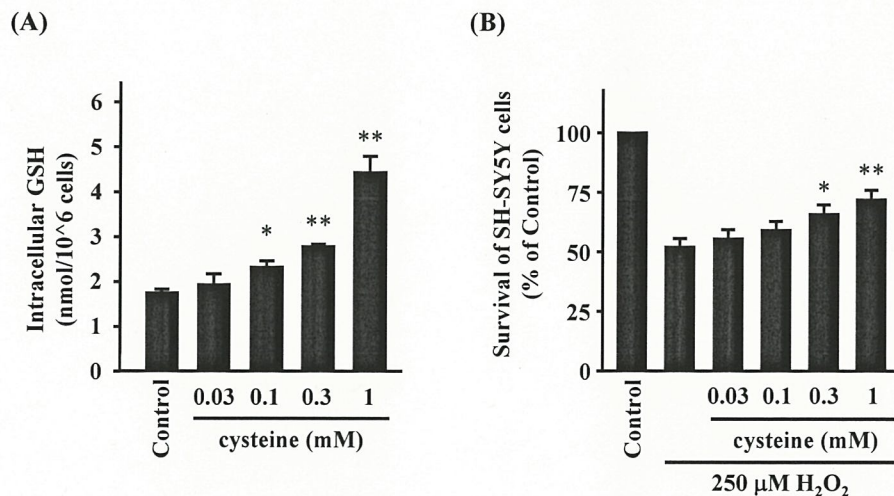


Figure 20. Effect of cysteine on the levels of intracellular GSH and  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced cell death in SH-SY5Y cells.

(A) Cells were treated with cysteine at the indicated concentrations for 24 h. Intracellular GSH concentrations were determined as described in Methods. (B) Cells were treated with cysteine at the indicated concentrations for 24 h. Then the cells were treated with 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. The cell viability was determined by MTT assay. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01



## 2.2 初代培養神経細胞とアストロサイトの混合培養系におけるノルアドレナリンによるアストロサイトを介した神経保護作用

ノルアドレナリンによるアストロサイトを介した神経保護作用が、初代培養細胞においてもみられるか否かを明らかにする目的で、マウス胎児の脳を用いて、初代培養神経細胞の培養系及び初代培養神経細胞とアストロサイトの混合培養系を構築した。

各培養系における神経細胞とアストロサイトの存在比を蛍光免疫染色法により検討した。その結果、初代培養神経細胞の培養系では、約 95% が神経細胞であった (Fig. 21)。一方、初代培養神経細胞とアストロサイトの混合培養系では、神経細胞とアストロサイトの比率が約 1:1 であった。

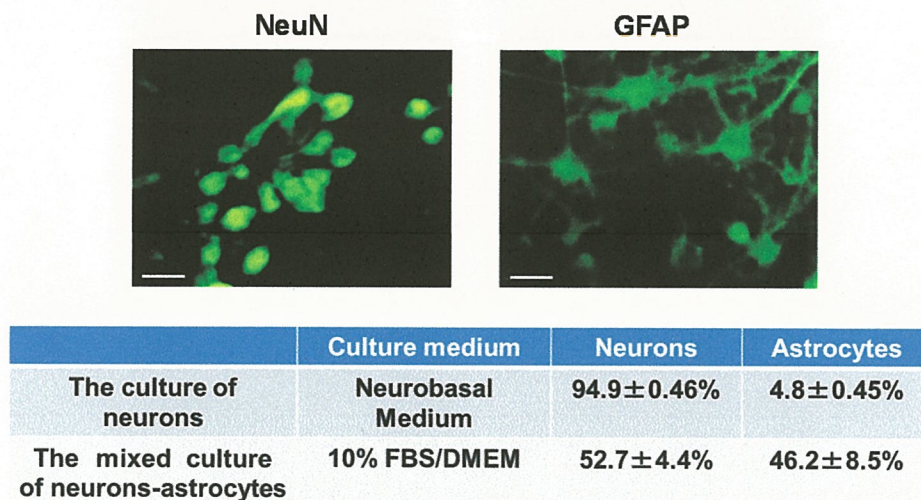


Figure 21. Primary culture of neurons and neurons-astrocytes mixed culture

The culture of neurons and the mixed culture of neurons-astrocytes were immunostained with antibodies to NeuN and GFAP, neuronal and astrocytic markers, respectively. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342. Fluorescence images of the mixed culture were taken using a fluorescence microscope (upper photographs). The numbers of NeuN- or GFAP-positive cells were counted and expressed as percentage of total cell population (lower table). Results show the representative photographs and the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 3 independent experiments. Scale bar, 10  $\mu$ m.

初代培養神経細胞の培養系において、 $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発神経細胞死に対するノルアドレナリンの影響を検討した。

初代培養神経細胞の培養系において、 $\text{H}_2\text{O}_2$  (10-100  $\mu\text{M}$ ) の24時間処置は、濃度依存的に神経細胞死を誘導した (Fig. 22A)。ノルアドレナリン (0.3-30  $\mu\text{M}$ ) の24時間前処置は、いずれの濃度においても、その細胞死に影響を与えなかった (Fig. 22B)。

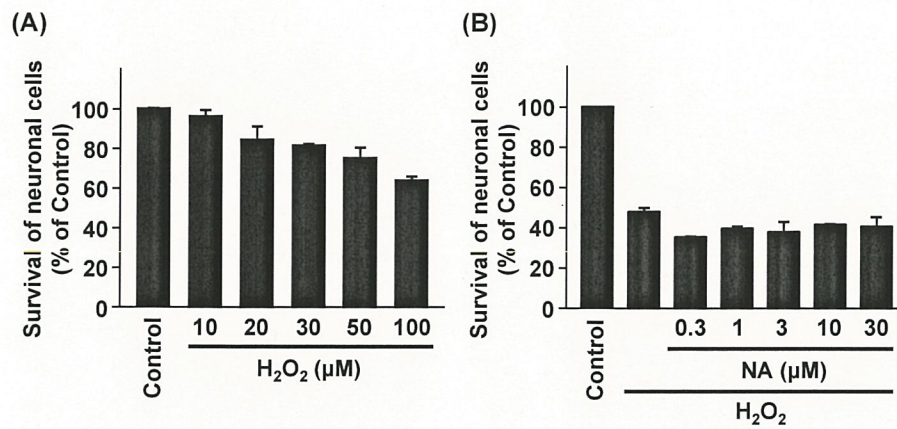


Figure 22. Effect of pretreatment with noradrenaline on  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced cell death in primary culture of neurons.

(A) The primary culture of neurons was treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  at the indicated concentrations for 24 h. (B) The culture of neurons was treated with noradrenaline (NA) at the indicated concentrations for 24 h. Then the cells were treated with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. The viability of neurons was determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments.

次に、初代培養神経細胞とアストロサイトの混合培養系において、 $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発神経細胞死に対するノルアドレナリンの影響について検討した。

混合培養系において、 $\text{H}_2\text{O}_2$  (10-100  $\mu\text{M}$ ) は濃度依存的に神経細胞死を誘導した(Fig. 23A)。ノルアドレナリン (0.3-30  $\mu\text{M}$ ) の24時間前処置は、その濃度依存的に  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発神経細胞死を抑制した (Fig. 23B)。

これらの結果から、初代培養細胞において、ノルアドレナリンはアストロサイトを介して  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発神経細胞死を抑制することが示唆された。

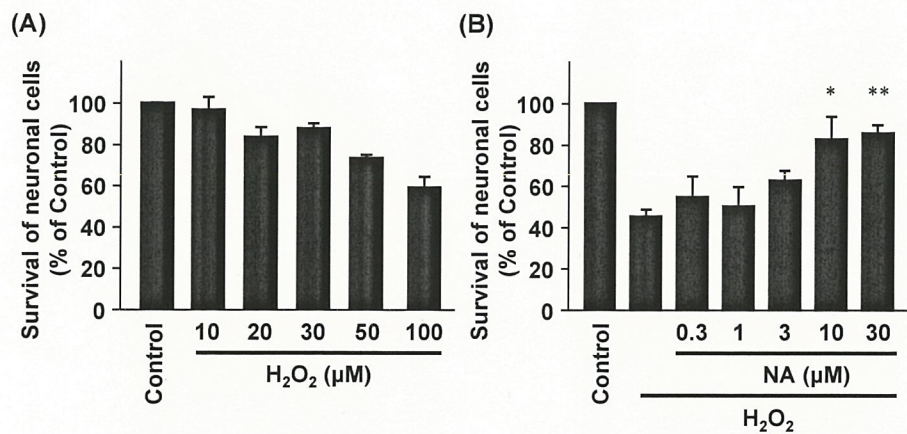


Figure 23. Effect of pretreatment with noradrenaline on  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced death of neurons in mixed culture of neurons and astrocytes

(A) The mixed culture was treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  at the indicated concentrations for 24 h. (B) The mixed culture was treated with noradrenaline (NA) at the indicated concentrations for 24 h. Then the culture was treated with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. The viability of neurons was determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$



次に、混合培養系におけるノルアドレナリンによる  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発神経細胞死抑制作用への  $\beta_3$  受容体の関与について検討した。

混合培養系において、 $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) により誘発される神経細胞死は、ノルアドレナリン (10  $\mu\text{M}$ ) 前処置により抑制され、この抑制作用は、 $\beta_3$  受容体選択的遮断薬の SR 59230A (10  $\mu\text{M}$ ) によりほぼ完全に阻害された (Fig. 24A)。また、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬 CL 316243 (2  $\mu\text{M}$ ) の 24 時間前処置は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発神経細胞死を有意に抑制した (Fig. 24B)。

これらの結果から、混合培養系において、ノルアドレナリンは、アストロサイトの  $\beta_3$  受容体に作用することにより、 $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発神経細胞死を抑制することが示唆された。

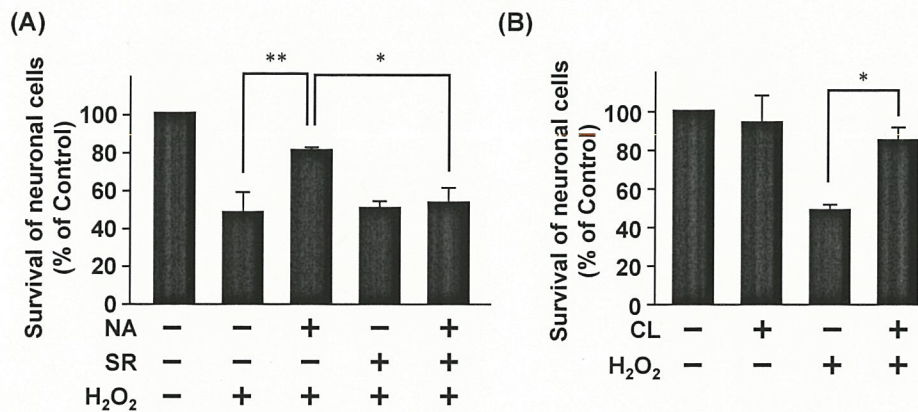


Figure 24. Noradrenaline protects neurons from  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced death via  $\beta_3$ -adrenoceptor stimulation in mixed culture of neurons and astrocytes

(A) The mixed culture was treated for 24 h with 10  $\mu\text{M}$  noradrenaline (NA) in the absence or presence of 10  $\mu\text{M}$  SR59230A (SR). Then the cells were treated with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. (B) The mixed culture of neurons-astrocytes was treated with 2  $\mu\text{M}$  CL316243 (CL) for 24 h. Then the cells were treated with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. The viability of neurons was determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , N.S.; not significant



次に、混合培養系におけるノルアドレナリンによる  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発神経細胞死抑制作用への GSH の関与を明らかにする目的で、BSO の影響について検討した。

初代培養アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン (10  $\mu\text{M}$ ) による細胞内 GSH 量の増加は、BSO (1  $\mu\text{M}$ ) 存在下で有意に阻害された (Fig. 25A)。また、混合培養系において、ノルアドレナリン (10  $\mu\text{M}$ ) 前処置による  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発神経細胞死抑制作用は、BSO (1  $\mu\text{M}$ ) の存在下で完全に阻害された (Fig. 25B)。

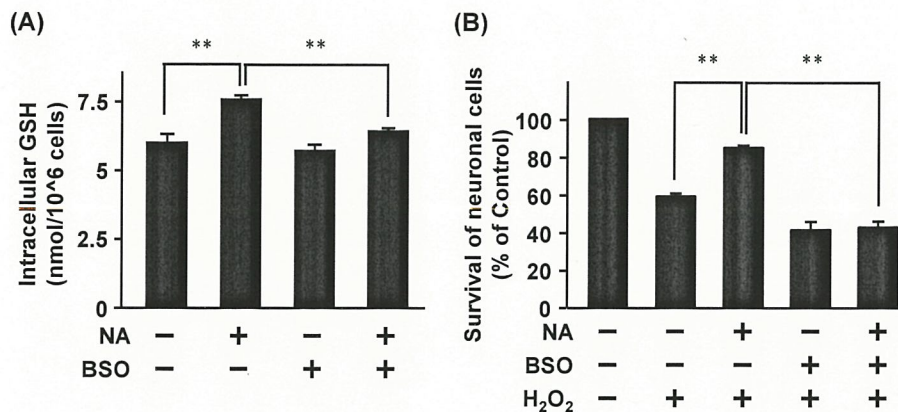


Figure 25. Effect of BSO on the neuroprotective effect of pretreatment with noradrenaline in mixed culture of neurons and astrocytes

(A) Mouse primary astrocytes were treated for 24 h with 10  $\mu\text{M}$  noradrenaline (NA) in the absence or presence of 1  $\mu\text{M}$  BSO. The intracellular level of GSH was determined as described in Methods. (B) The mixed culture of neurons-astrocytes was treated for 24 h with 10  $\mu\text{M}$  NA in the absence or presence of 1  $\mu\text{M}$  BSO. Then the cells were treated with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. The viability of neurons was determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments.  $**P < 0.01$

次に、混合培養系におけるノルアドレナリンによる  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発神経細胞死抑制作用への MRP1 の関与を明らかにする目的で、MRP1 阻害薬の MK571 の影響について検討した。

混合培養系において、ノルアドレナリン ( $10\ \mu\text{M}$ ) 前処置による  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発神経細胞死抑制作用は、MK571 ( $10\ \mu\text{M}$ ) の存在下でほぼ完全に阻害された (Fig. 26)。

これらの結果から、混合培養系において、ノルアドレナリンは、アストロサイトの  $\beta_3$  受容体を介して、アストロサイトでの GSH 合成と MRP1 を介した GSH 放出を促進し、神経細胞へのシステイン供給を増加することにより、神経細胞内の GSH 量を増加させ、神経細胞を  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発細胞死から保護することが示唆された。

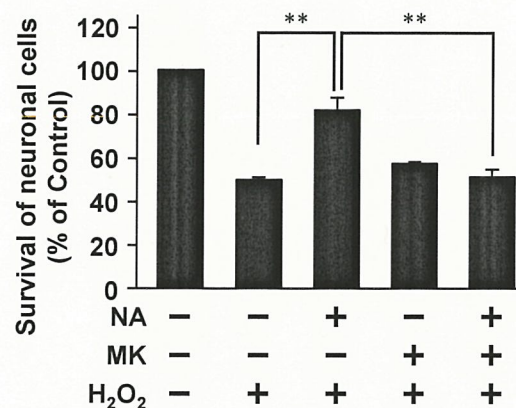


Figure 26. Effect of MK571 on the neuroprotective effect of pretreatment with noradrenaline in mixed culture of neurons and astrocytes

The mixed culture was treated for 24 h with  $10\ \mu\text{M}$  noradrenaline (NA) in the absence or presence of  $10\ \mu\text{M}$  MK571 (MK). Then the cells were treated with  $100\ \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. The viability of neurons was determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments.  $**P < 0.01$

### 2.3 初代培養ドパミン神経細胞とアストロサイトの混合培養系におけるノルアドレナリンによるアストロサイトを介した神経保護作用

パーキンソン病においてノルアドレナリンは、ドパミン神経細胞保護的に働くことが報告されている<sup>22-24)</sup>。そこで、ノルアドレナリンが初代培養ドパミン神経細胞に対して神経保護作用を示すか否かを明らかにする目的で、マウス胎児の中脳を用いて、初代培養ドパミン神経細胞とアストロサイトの混合培養系を構築した。

初代培養ドパミン神経細胞とアストロサイトの混合培養系において、ドパミン神経細胞、その他の神経細胞及びアストロサイトの存在比を蛍光免疫染色により検討した。その結果、ドパミン神経細胞、その他の神経細胞及びアストロサイトの比率は、それぞれ  $1.5 \pm 0.67\%$ 、 $57.2 \pm 4.97\%$  及び  $35.8 \pm 3.14\%$  であった (Fig. 27)。

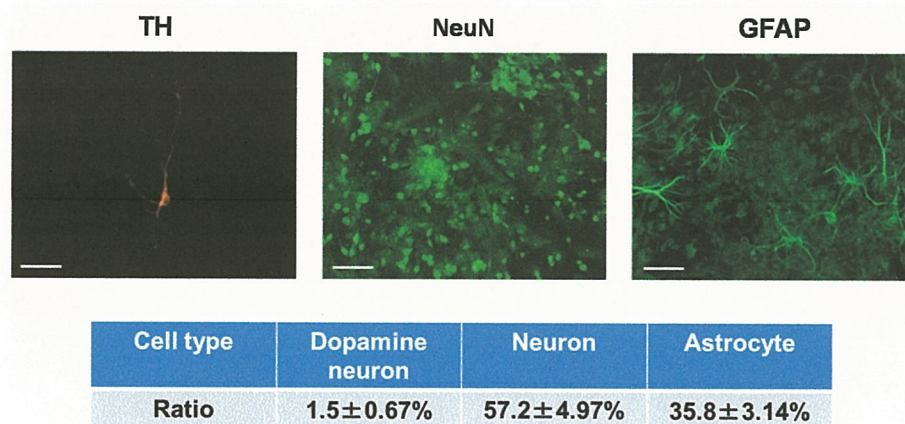


Figure 27. Primary mesencephalic culture.

Primary mesencephalic culture was immunostained with antibodies to TH, NeuN and GFAP. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342. Fluorescence images of the culture were taken using a fluorescence microscope (upper photographs). The numbers of TH-, NeuN- or GFAP-positive cells were counted and expressed as percentage of total cell population (lower table). Results show the representative photographs and the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 3 independent experiments. Scale bar, 50 $\mu$ m.



初代培養ドパミン神経細胞とアストロサイトの混合培養系において、 $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発ドパミン神経細胞死に対するノルアドレナリンの影響について検討した。

初代培養ドパミン神経細胞とアストロサイトの混合培養系において、 $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) を 24 時間処置することにより、ドパミン神経細胞に細胞死が誘導されたが、この細胞死はノルアドレナリン (10  $\mu\text{M}$ ) を 24 時間前処置することにより有意に抑制された (Fig. 28)。

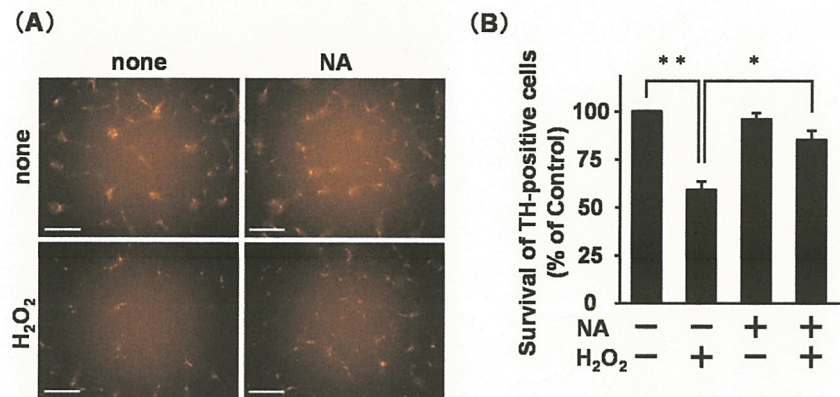


Figure 28. Effect of pretreatment with noradrenaline on  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced death of dopamine neurons in primary mesencephalic culture.

Primary mesencephalic culture was treated with 10  $\mu\text{M}$  noradrenaline (NA) for 24 h. Then the culture was treated with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. The viability of dopamine neurons was determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ .

次に、初代培養ドパミン神経細胞とアストロサイトの混合培養系におけるノルアドレナリンによる  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発ドパミン神経細胞死抑制作用への  $\beta_3$  受容体の関与について検討した。

初代培養ドパミン神経細胞とアストロサイトの混合培養系において、ノルアドレナリン (10  $\mu\text{M}$ ) 前処置による、 $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発ドパミン神経細胞死抑制作用は、SR59230A (10  $\mu\text{M}$ ) により阻害された (Fig. 29A)。また、CL 316243 (2  $\mu\text{M}$ ) 前処置は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発ドパミン神経細胞死を有意に抑制した (Fig. 29B)。

これらの結果から、初代培養ドパミン神経細胞とアストロサイトの混合培養系において、ノルアドレナリンはアストロサイトの  $\beta_3$  受容体を介して、ドパミン神経細胞の  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発細胞死を抑制することが示唆された。

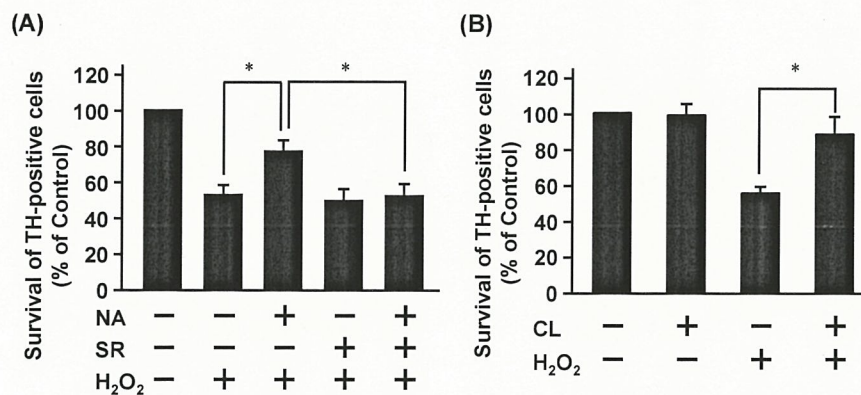


Figure 29. Noradrenaline protects dopamine neurons from  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced death via  $\beta_3$ -adrenoreceptor stimulation in primary mesencephalic culture.

(A) Primary mesencephalic culture was treated for 24 h with 10  $\mu\text{M}$  noradrenaline (NA) in the absence 10  $\mu\text{M}$  SR59230A (SR). Then the cells were treated with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. (B) Primary mesencephalic culture was treated with 2  $\mu\text{M}$  CL316243 (CL) for 24 h. Then the cells were treated with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. The viability of dopamine neurons was determined as described in Methods. Results show the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 3 independent experiments. \* $P < 0.05$ , N.S.; not significant



## 考 察

本研究において、ノルアドレナリンは、SH-SY5Y 細胞の単独培養系において、 $H_2O_2$  誘発神経細胞死に影響を与えなかった (Fig. 13B)。また、初代培養神経細胞の単独培養系においても、 $H_2O_2$  誘発神経細胞死に影響を与えなかった (Fig. 22B)。一方、ノルアドレナリンは、U-251 MG 細胞と SH-SY5Y 細胞の混合培養系での SH-SY5Y 細胞の  $H_2O_2$  誘発細胞死を抑制した (Fig. 15B)。この細胞死抑制作用は、GSH 合成阻害薬 BSO により阻害された (Fig. 17B)。また、マウス初代培養神経細胞とアストロサイトの混合培養系においても、ノルアドレナリンの  $H_2O_2$  誘発神経細胞死抑制作用が BSO により阻害された (Fig. 25B)。これらの結果は、ノルアドレナリンが、アストロサイトを介して神経保護作用を示すこと、その神経保護作用は GSH 依存的であることを示唆している。本研究において、U-251 MG 細胞と SH-SY5Y 細胞の混合培養系でのノルアドレナリンによる SH-SY5Y 細胞の  $H_2O_2$  誘発細胞死抑制作用は、 $\beta_3$  受容体選択的遮断薬 SR58611A により阻害された (Fig. 16A)。また、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬 CL316243 は、U-251 MG 細胞と SH-SY5Y 細胞の混合培養系での SH-SY5Y 細胞の  $H_2O_2$  誘発細胞死を抑制した (Fig. 16B)。さらに、マウス初代培養神経細胞とアストロサイトの混合培養系及びマウス初代培養ドパミン神経細胞とアストロサイトの混合培養系においても、ノルアドレナリンは、 $H_2O_2$  誘発神経細胞死を抑制した (Fig. 23B, 28B)。また、この細胞死抑制作用は、SR59230A によりほぼ完全に阻害された (Fig. 24A, 29A)。これらの結果から、ノルアドレナリンは、アストロサイトの  $\beta_3$  受容体に作用することにより、 $H_2O_2$  誘発神経細胞死を抑制することが示唆された。一方、ラット初代培養ドパミン神経細胞において、ノルアドレナリンは、アドレナリン受容体を介さずに酸化ストレス誘発ドパミン神経細胞死を抑制すること、その細胞死抑制作用は、GSH 非依存的であることが報告されている<sup>77)</sup>。これらの相違は、細胞種の違いや実験条件の違いに起因するのかもしれない。ノルアドレナリンによるアドレナリン受容体を介さない GSH 非依存的なドパミン神経細胞保護作用については今後の検討課題ではあるが、ノルアドレナリンによるドパミン神経細胞死抑制作用は、SR59230A によりほぼ完全に阻害されたことから (Fig. 29A)、本研究でのノルアドレナリンによるドパミン神経細胞死抑制作用には、アドレナリン受容体を介さない機構は関与しないことが示唆された。

アストロサイトによる細胞外への GSH 放出は、隣接する神経細胞の細胞内 GSH 量の維持や酸化ストレスからの神経細胞の保護に非常に重要な役割を果たしていると考えられる<sup>14-16)</sup>。また、アストロサイトは、多剤耐性蛋白質である MRP1 や gap 結合構成蛋白質である connexin 43 のヘミチャネル形成などを介して GSH を細胞外へ放出することが報告されている<sup>15,76,78,79)</sup>。本研究において、ノルアドレナリンは、U-251 MG 細胞と SH-SY5Y 細胞の混合培養系での SH-SY5Y 細胞の細胞内 GSH 量を増加させた (Fig. 18C)。この増加は、 $\beta_3$  受容体選択的遮断薬 SR59230A により阻害された (Fig. 18C)。また、U-251 MG 細胞と SH-SY5Y 細胞の混合培養系でのノルアドレナリンによる SH-SY5Y 細胞の細胞内 GSH 量の増加は、



MRP1 阻害薬 MK571 によりほぼ完全に阻害された (Fig. 19B)。さらに、第一章において、ノルアドレナリンは U-251 MG 細胞から細胞外への GSH 放出量を増加させることを示した。また、本研究において、U-251 MG 細胞と SH-SY5Y 細胞の混合培養系及びマウス初代培養神経細胞とアストロサイトの混合培養系でのノルアドレナリンによる神経保護作用は、MK571 により阻害された (Fig. 19A, 26)。これらの結果から、ノルアドレナリンは、アストロサイトの  $\beta_3$  受容体を刺激して細胞内 GSH 量を増加させて、MRP1 を介する GSH 放出を促進し、神経細胞へのシステイン供給を増加させ、神経細胞の GSH 量を増加させることで、酸化ストレス誘発細胞死から神経細胞を保護することが示唆された。

パーキンソン病は、進行性の神経変性疾患であり、パーキンソン病患者の脳では GSH 量が著明に減少し、酸化ストレスの指標である thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) が増加していることが報告されている<sup>80-82)</sup>。また、パーキンソン病患者の脳では、青斑核のノルアドレナリン神経が疾患の初期に脱落することが報告されている<sup>83)</sup>。これらの報告と本研究の結果から、パーキンソン病患者の脳では、ノルアドレナリンが減少することにより、アストロサイトでの  $\beta_3$  受容体の刺激による GSH 産生と細胞外への GSH 放出が減少した結果、神経細胞内の GSH 量が減少し、酸化ストレスに対して神経細胞が脆弱になっていることが示唆され、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬が、ドパミン神経細胞死を抑制し、パーキンソン病の進行を抑制する治療薬となる可能性が考えられた。

第三章では、*in vivo* において、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬が脳内 GSH 量を増加させ、ドパミン神経細胞保護作用を示すか否かを明らかにする目的で、脳内 GSH 量及びパーキンソン病動物モデルにおけるドパミン神経細胞死に対する  $\beta_3$  受容体選択的作用薬投与の影響について検討した。

### 第三章 脳内 GSH 量と MPTP 誘発ドパミン神経細胞死に対する $\beta_3$ 受容体選択的作用薬 SR58611A の影響

パーキンソン病は、黒質のドパミン神経細胞が変性・脱落することにより生じる運動機能障害を主症状とする進行性の神経変性疾患である<sup>84)</sup>。発症初期には薬物による対症療法が非常に有効であるが、疾患は進行し、経過とともに薬物による症状のコントロールは不良となる<sup>85)</sup>。このため、疾患の進行を抑制する薬物の開発が切望されているが、現在のところ、ドパミン神経細胞死を抑制し、疾患の進行を抑制する薬物は存在しない。パーキンソン病患者の中脳黒質では GSH 量が著明に減少し、過酸化脂質の増加がみられることなどから、本疾患におけるドパミン神経細胞死には酸化的ストレスが密接に関与すると考えられている<sup>75-77)</sup>。

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) は、パーキンソン病動物モデルの作製に用いられる選択的なドパミン神経毒である<sup>86, 87)</sup>。MPTP は、脳内のアストロサイトに取り込まれ、monoamine oxidase-B により酸化されて MPP<sup>+</sup> となる。MPP<sup>+</sup> は、アストロサイトから放出され、ドパミントランスポーターを介してドパミン神経細胞に選択的に取り込まれ、ミトコンドリアの電子伝達系の複合体 I を阻害し、ATP 合成を障害する。また、MPP<sup>+</sup> によるミトコンドリアの電子伝達系の複合体 I の阻害は、ミトコンドリアからの ROS の産生を増加させ、ドパミン神経細胞を障害することが報告されている<sup>88-90)</sup>。

アミベグロン (SR58611A) は、サノフィ・アベンティス社により開発された  $\beta_3$  受容体選択的作用薬である。SR58611A は、脂溶性が高く、経口投与により脳内に移行することが報告されている<sup>91)</sup>。SR58611A は、実験動物を用いた検討において抗うつ作用を示したため<sup>92,93)</sup>、大うつ病性障害の新規治療薬として臨床試験が行われたが、第Ⅲ相試験において十分な抗うつ作用を示せず、その開発は中止された。

本研究において、第一章で、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬がアストロサイトの細胞内 GSH 量を増加させることを示した。また、第二章で、ノルアドレナリンがアストロサイトの  $\beta_3$  受容体を介して GSH 放出を促進することで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による酸化的ストレス誘発神経細胞死を抑制すること、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による酸化的ストレス誘発ドパミン神経細胞死を抑制することを示した。これらのことから、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬は、アストロサイトの GSH 産生と放出を促進することで、ドパミン神経細胞を酸化的ストレス誘発細胞死から保護し、パーキンソン病の進行を抑制する新たな治療薬となる可能性が考えられる。

本章では、脳内 GSH 量及び MPTP 誘発ドパミン神経細胞死への  $\beta_3$  選択的受容体作用薬 SR58611A 投与の影響について検討した。



## 実験方法

### 1) 薬物および細胞および抗体

MPTP は Sigma より購入した。SR58611A は Tocris より購入した。抗  $\beta_3$  受容体抗体及び抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体は Santa Cruz Biotechnology より購入した。その他の試薬は、WAKO Pure Chemicals より購入した。

### 2) 実験動物及び薬物投与

実験に供した 8-10 週齢の C57BL/6 マウスは透明ケージで飼育し、室温:  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照明時間: 1 日 12 時間の条件下で、餌と水を自由に摂取させた。動物実験の飼育、実験等はすべて日本薬理学会の動物実験に関する指針に基づき、摂南大学の動物実験に関する規定に従い実施した。SR58611A は、DMSO に溶解した後、生理食塩水で DMSO の終濃度が 10% になるように希釈し、腹腔内に投与した。SR58611A は、組織内 GSH 量及び GCLc の発現量の検討には 1 回、MPTP 誘発ドパミン神経細胞死の検討では、1 日 1 回、計 8 回投与した。MPTP は、SR58611A の最終投与 2 時間後から、マウス腹腔内に MPTP (25 mg/kg) を 2 時間毎に 4 回投与した。

### 3) 脳組織の摘出及び試料の調製

薬物投与後、マウスを抱水クロラル麻酔下にて、右心房を切開し、左心室から体重量と同量 (w/v) の PBS (一) を灌流することにより脱血した後、脳を摘出し、11 部位 (嗅球、前頭葉、大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、中脳背側部、中脳腹側部、小脳、橋・延髄) に分画した。各脳組織に組織重量の 20 倍量 (w/v) の lysis buffer (0.5 M Sodium phosphate、10% Triton X-100、pH 7.5) を加え、ハンディホモジナイザーによりホモジナイズした後、20 分間氷上で静置した。4°C、 $17,400 \times g$ 、5 分間遠心し、上清を回収し試料とした。

### 4) Western blot 法

脳組織試料を蛋白定量した後、5 × Laemmli buffer (125 mM Tris-HCl、25% glycerol、5% SDS、0.2% bromophenol blue、10% 2-mercaptoethanol、pH 7.5) を加えて 100°C、10 分間熱処理を行い、蛋白を変性させた。等量の蛋白質 (20  $\mu\text{g}$ ) を 10% の SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動により分離した後、immobilon-P transfer membrane に転写した。その後、第一章の方法に準じて、一次抗体として抗  $\beta_3$  受容体抗体 (1:1,000) あるいは抗 GCLc 抗体 (1:1,000) を用いて、 $\beta_3$  受容体蛋白質及び GCLc 蛋白質のバンドを X 線フィルムに検出した。

### 5) 組織内 GSH 量の測定

脳組織内 GSH 量は、脳組織試料を用いて、第一章の方法に準じて DTNB リサイクリング



法により測定した。脳組織内 GSH 量は、脳組織 1 mg あたりの GSH 量として表した。

#### 6) 間接酵素抗体法による免疫組織染色

薬物投与後、マウスを抱水クロラル麻酔下にて、右心房を切開し、左心室から体重量と同量 (w/v) の PBS (ー) を灌流することにより脱血した後、さらに、体重量と同量 (w/v) の 4% パラホルムアルデヒド溶液を灌流し、固定した。脳を摘出後、4% パラホルムアルデヒド溶液で後固定した後 (4°C、overnight)、30% スクロースを含む PBS (ー) に 24 時間浸漬した。OCT コンパウンドを用いて -80°C で脳を急速凍結した後、クライオスタットを用いて 30  $\mu$ m の厚さの切片を作製した。切片を PBS (ー) で洗浄した後、0.09% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む PBS (ー) 溶液で 20 分間インキュベートすることにより内因性 peroxidase を不活性化した。PBS (ー) で洗浄後、1% FBS、0.5% Triton-X を含む TBS でブロッキングを行い (室温、30 分)、1% FBS、0.5% Triton-X を含む TBS で希釈した抗 TH 抗体 (1:300) と 4°C で一晩反応させた。切片を PBS (ー) で洗浄した後、1% FBS、0.5% Triton-X を含む TBS で希釈した HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体 (1:200) と室温で 1 時間反応させた。切片を 0.1% Triton-X 100 を含む TBS で洗浄した後、Impact™ DAB (Vector Laboratories, CA, USA) を用いて発色させた。Hematoxylin により対比染色を行い、ethanol による脱水及び xylene による透徹後、マウントクイック (Daido Sangyo, Tokyo, Japan) により封入し、光学顕微鏡で観察した。TH 陽性細胞数は、作製した黒質の連続切片のうちの三分の一の枚数を計測後、黒質あたりの数を算出しグラフ化した。

#### 7) データ解析

実験結果は、3-4 例の平均値  $\pm$  S.E.M.、あるいは、3-4 例の代表例として表した。有意差検定は ANOVA を行い、post-hoc test として Scheffe's test または Dunnett's test を行った。

## 実験結果

### 3.1 脳内 GSH 量に対する $\beta_3$ 受容体選択的作用薬 SR58611A 投与の影響

脳内 GSH 量に対する  $\beta_3$  受容体選択的作用薬投与の影響を明らかにする目的で、マウスの脳における  $\beta_3$  受容体の発現を Western blot 法により検討した。その結果、嗅球、前頭葉、大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、中脳背側部、中脳腹側部、小脳、橋・延髄の検討した全ての脳組織において、 $\beta_3$  受容体蛋白質の発現が認められた (Fig. 30)。

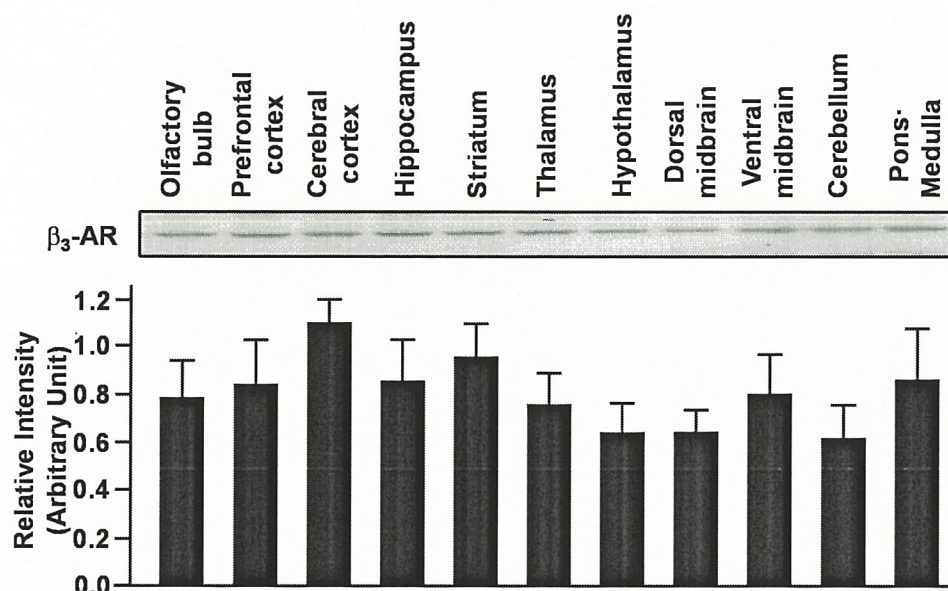


Figure 30. The expression of  $\beta_3$ -adrenoceptor in the mouse brain.

The protein expression of  $\beta_3$ -adrenoceptor ( $\beta_3$ -AR) in olfactory bulb, prefrontal cortex, cerebral cortex, hippocampus, striatum, thalamus, hypothalamus, dorsal midbrain, ventral midbrain, cerebellum and pons • medulla was examined by Western blotting. Relative intensity of the bands, quantified by densitometry, is shown below the protein bands. The level of  $\beta_3$ -AR protein was expressed as relative to the maximum expression level, which was arbitrarily set as 1.0. Results are representative of 4 independent experiments and the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 independent experiments.

次に、各脳組織での組織内 GSH 量に対する  $\beta_3$  受容体選択的作用薬投与の影響について検討した。

第二章で用いた  $\beta_3$  受容体選択的遮断薬 CL316243 は水溶性の薬物であり、脳内移行性が低いと考えられたため、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬として、脂溶性が高く、脳内に移行することが報告されている SR58611A を用いた。

マウスに SR58611A (5 mg/kg, 10 mg/kg) を腹腔内投与することにより、24 時間後の嗅球、前頭葉、大脳皮質、海馬、線条体、視床下部、中脳腹側部での組織内 GSH 量は有意に増加した (Fig. 31, 32)。

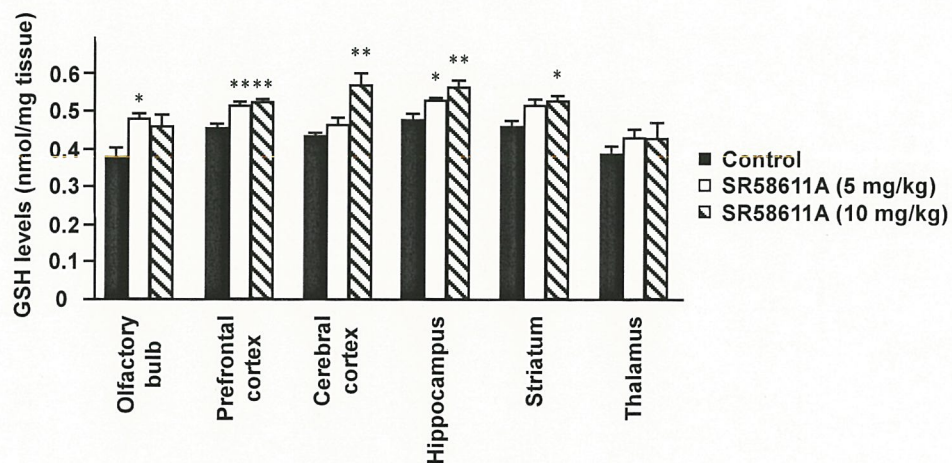


Figure 31. Effect of SR58611A on the GSH concentration in olfactory bulb, prefrontal cortex, cerebral cortex, hippocampus, striatum and thalamus.

Mice were administered with SR58611A (5 mg/kg, 10 mg/kg) i.p. Mice were sacrificed 24 h after SR58611A administration. The concentration of GSH in olfactory bulb, prefrontal cortex, cerebral cortex, hippocampus, striatum and thalamus was determined as described in Methods. Results show the mean + S.E.M. obtained from 6 independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Control.



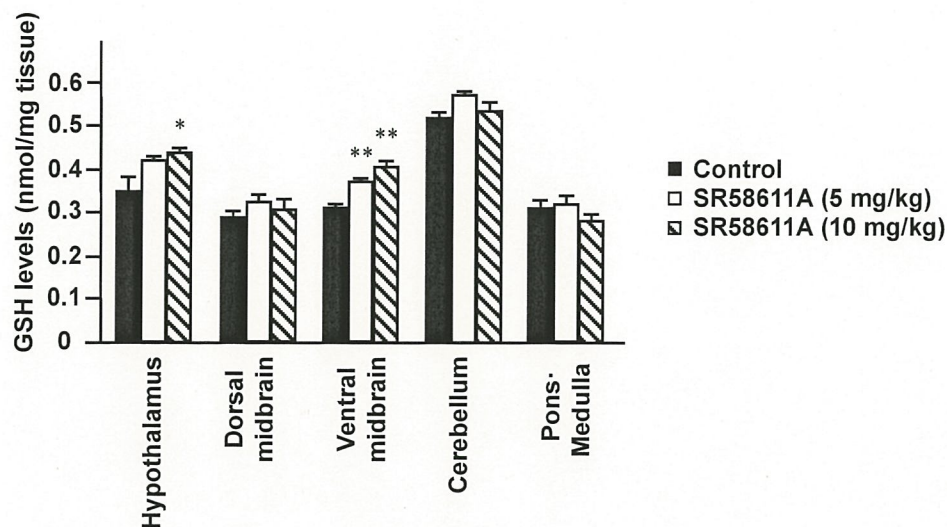


Figure 32. Effect of SR58611A on the GSH concentration in striatum, thalamus, hypothalamus, dorsal midbrain ventral midbrain cerebellum and pons/medulla.

Mice were administered with SR58611A (5 mg/kg, 10 mg/kg) i.p. Mice were sacrificed 24 h after SR58611A administration. The concentration of GSH in striatum, thalamus, hypothalamus, dorsal midbrain ventral midbrain cerebellum and pons/medulla was determined as described in Methods. Results show the mean + S.E.M. obtained from 6 independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Control.

次に、各脳組織での GCLc の発現量に対する SR58611A 投与の影響について Western blot 法により検討した。

マウスに SR58611A (5 mg/kg, 10 mg/kg) を腹腔内投与することにより、24 時間後の嗅球、前頭葉、大脳皮質、線条体、視床下部、中脳腹側部での GCLc の発現量は有意に増加した (Fig. 33, 34)。また、海馬での GCLc の発現量も SR58611A 投与により増加する傾向を示した。

これらの結果から、嗅球、前頭葉、大脳皮質、海馬、線条体、視床下部、中脳腹側部では、SR58611A の投与により、アストロサイトの  $\beta_3$  受容体が刺激されることで GCLc が発現誘導され、組織内 GSH 量が増加することが示唆された。

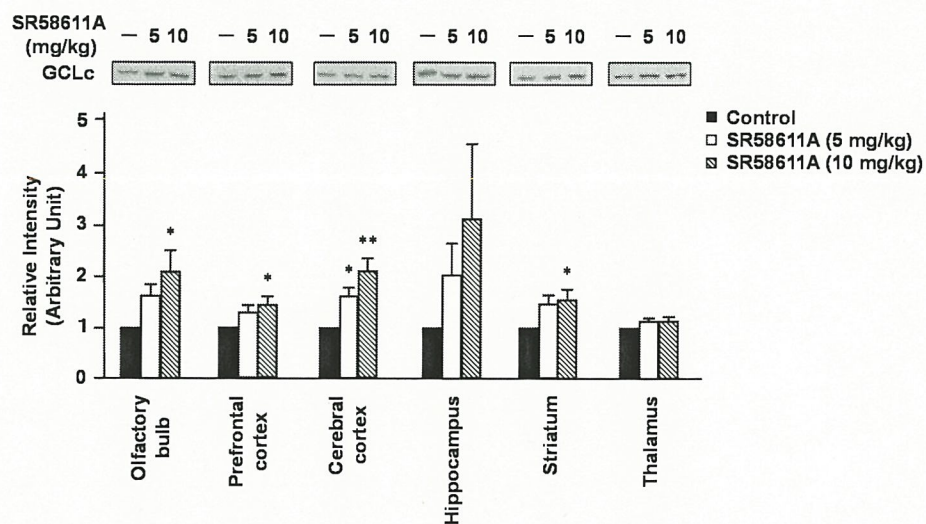


Figure 33. Effect of SR58611A on the expression of GCLc protein in olfactory bulb, prefrontal cortex, cerebral cortex, hippocampus, striatum and thalamus.

Mice were administered with SR58611A (5 mg/kg, 10 mg/kg) i.p. Mice were sacrificed 24 h after the SR58611A administration. The level of GCLc protein was determined by Western blotting. Relative intensity of the bands, quantified by densitometry, is shown below the protein bands. The level of GCLc was expressed as relative intensity compared with that of the control (arbitrarily set as "1.0"). Results show representative blots of 4 independent experiments and the mean + S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Control.

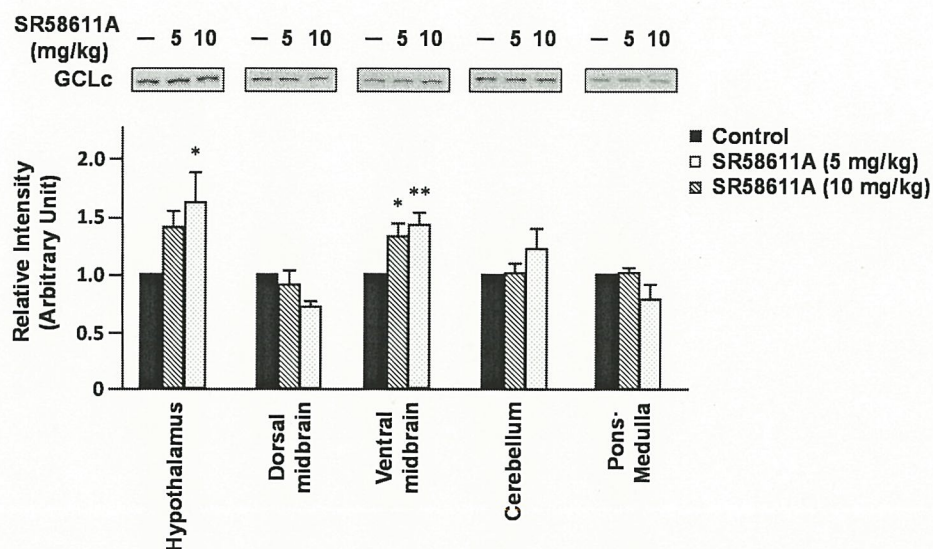


Figure 34. Effect of SR58611A on the expression of GCLc protein in stritum, thalamus, hypothalamus, dorsal midbrain ventral midbrain cerebellum, pons + medulla.

Mice were administered with SR58611A (5 mg/kg, 10 mg/kg) i.p. once a day for 1 days. Mice were sacrificed 24 h after the SR58611A administration. The level of GCLc protein was determined by Western blotting. Relative intensity of the bands, quantified by densitometry, is shown below the protein bands. The level of GCLc was expressed as relative intensity compared with that of the control (arbitrarily set as "1.0"). Results show representative blots of 4 independent experiments and the mean + S.E.M. obtained from 4 independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Control.



### 3.2 MPTP 誘発ドパミン神経細胞死に対する SR58611A 投与の影響

MPTP は、マウスに投与することで、ドパミン神経細胞選択的に細胞死を誘発することが報告されている<sup>81, 82)</sup>。マウスにおける MPTP 誘発ドパミン神経細胞死が SR58611A の投与により抑制されるか否かを明らかにする目的で、MPTP 投与後の中脳黒室のドパミン神経細胞数を免疫組織化学的手法により検討した。

MPTP (25 mg × 4) の投与により、3 日後の黒質の TH 陽性細胞数は、対照群と比較して有意に減少していた (Fig. 35)。この減少は、SR58611A (5 mg/kg) 投与群において有意に抑制された。

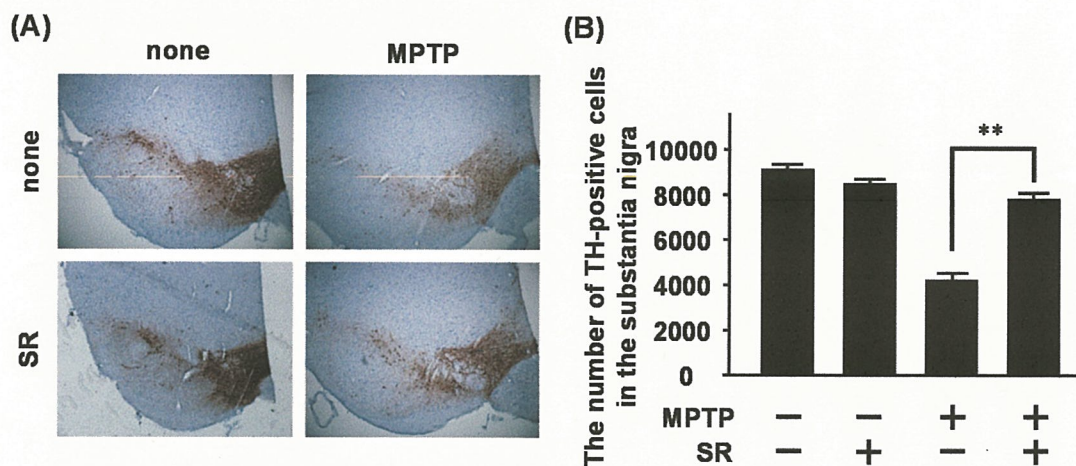


Figure 35. Effect of SR58611A on MPTP-induced loss of dopamine neuron.

Mice were administered with 5 mg/kg SR58611A i.p. once a day for 8 days. Two hours after final administration of SR58611A, MPTP (25mg/kg) was administered i.p. four times at 2 h intervals. Mice were sacrificed 3 days after MPTP administration, and brain sections were immunostained for TH. (A) Representative photographs of TH expression in substantia nigra in control and MPTP-treated mice are shown. Results show photographs representative of 6 independent experiments. (B) The number of TH-positive cells in the substantia nigra is shown. Results show the mean + S.E.M. obtained from 6 independent experiments. \*\* $P < 0.01$

## 考 察

$\beta_3$  受容体選択的作用薬 SR58611A は、ラットやマウスにおいて、海馬での brain-derived neurotrophic factor の発現量や cAMP-response element binding protein のリン酸化量を増加させることにより抗うつ作用を示すことが報告されている<sup>94)</sup>。本研究において、SR58611A の投与により、嗅球、前頭葉、大脳皮質、海馬、線条体、視床下部、中脳腹側部での組織内 GSH 量は有意に増加した (Fig. 30, 31)。また、SR58611A の投与により、それらの部位における GCLc の発現量も増加した (Fig. 32, 33)。さらに、第一章において、ノルアドレナリンは  $\beta_3$  受容体を介して GCLc を発現誘導することでアストロサイトの細胞内 GSH 量を増加させることを示した。これらの結果から、嗅球、前頭葉、大脳皮質、海馬、線条体、視床下部、中脳腹側部では、SR58611A の投与により、アストロサイトの  $\beta_3$  受容体が刺激されることで GCLc が発現誘導され、組織内 GSH 量が増加することが示唆された。一方、中脳背側部、小脳、橋・延髄では、SR58611A の投与により、組織内 GSH 及び GCLc の発現量に変化はみられなかった (Fig. 30 - 33)。また、 $\beta_3$  受容体蛋白質の発現は、検討したすべての部位 (嗅球、前頭葉、大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、中脳背側部、中脳腹側部、小脳、橋・延髄) において認められ、また、 $\beta_3$  受容体蛋白質の発現量も組織ごとに大きな差はみられなかった (Fig. 30)。これらの結果の相違は、組織ごとの  $\beta_3$  受容体を発現している細胞種の違い、あるいは組織ごとのアストロサイトの機能の違いに起因している可能性が考えられた。このことに関連して、脳内には、原形質型アストロサイト、線維型アストロサイト、放射型アストロサイトなど、機能的に異なるアストロサイトのサブタイプが存在することが報告されており、小脳では、バークマングリアと呼ばれるグルタミン酸の取り込み能と代謝能が高い線維状のアストロサイトが多数存在することが知られている<sup>95-100)</sup>。 $\beta_3$  受容体を発現する細胞種及びアストロサイトのサブタイプごとの  $\beta_3$  受容体作用薬による GSH 産生誘導の違いは今後の検討課題ではあるが、本研究の結果から、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬は、嗅球、前頭葉、大脳皮質、海馬、線条体、視床下部、中脳腹側部において GSH の産生を誘導することが明らかになった。

MPTP によるドパミン神経細胞死には、ROS による酸化的ストレスが関与することが報告されている<sup>87-89)</sup>。本研究において、SR58611A の投与により、中脳腹側部での組織内 GSH 量は増加した (Fig. 33)。また、SR58611A 反復前投与により、MPTP による中脳黒質でのドパミン神経細胞数の減少が抑制された。これらの結果から、SR58611A は、ドパミン神経細胞内の GSH 量を増加させ、MPTP による細胞死を抑制することが示唆された。一方、本研究において、MPTP 投与 24 時間前の SR58611A の単回投与は、MPTP によるドパミン神経細胞数の減少を抑制する傾向を示したが、その差は有意ではなかった (date not shown)。このことは、アストロサイトで増加した GSH が放出され神経細胞内の GSH 量が増加するためには 24 時間以上の時間が必要であることを示しているのかもしれない。パーキンソン病患者の脳では、中脳黒質の GSH 量が著明に減少しており、酸化ストレスの指標である



TBARS 量が増加していること、青斑核のノルアドレナリン神経が疾患の初期に脱落することが報告されている<sup>79-82)</sup>。これらの報告と本研究の結果から、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬は、パーキンソン病患者脳で減少した GSH 量を回復することにより酸化ストレスによるドパミン神経細胞死を抑制し、疾患の進行を抑制する治療薬となる可能性が考えられた。

パーキンソン病患者脳内で減少したノルアドレナリン量を増加させ、すくみ足を改善する治療薬としてドロキシドパが用いられている<sup>101,102)</sup>。本研究の結果から、ドロキシドパは、脳内ノルアドレナリン量を増加させることで、アストロサイトでの GSH 産生と放出を増加させ、ドパミン神経保護作用を示す可能性が考えられる。しかしながら、パーキンソン病の進行に対するドロキシドパの影響を検討した臨床試験は存在せず、また、ドロキシドパのドパミン神経細胞保護作用に関する報告も存在しない。また、パーキンソン病患者の脳を用いた検討から、ノルアドレナリン神経線維が減少している部位とドパミン神経細胞の脱落している部位が相関することが報告されており<sup>103)</sup>、脱落したノルアドレナリン神経線維の周囲のドパミン神経細胞が脆弱になっていることが示唆される。ドロキシドパのドパミン神経保護作用に関しては今後の検討課題ではあるが、これらのことから、ドロキシドパにより増加したノルアドレナリンは、脱落したノルアドレナリン神経線維の周囲に存在するアストロサイトには作用せず、さらにその周囲のドパミン神経細胞に対して神経保護作用を示さない可能性が考えられた。一方、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬は、脱落したノルアドレナリン神経線維の周囲のアストロサイトにも作用することで、ドパミン神経細胞死を抑制する可能性があり、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬は、パーキンソン病の治療に有用である可能性が考えられた。

アルツハイマー病において、疾患の初期にノルアドレナリン神経細胞が脱落することが報告されている<sup>104,105)</sup>。また、アルツハイマー病では、大脳皮質や海馬の神経細胞が脱落することが知られており、アルツハイマー病患者脳では TBARS 量の増加がみられることから、アルツハイマー病でみられる神経細胞死には酸化ストレスが関与すると考えられている<sup>106-111)</sup>。本研究において、SR58611A は、大脳皮質及び海馬での組織内 GSH 量を増加させた (Fig. 32)。これらのことから、SR58611A は、アルツハイマー病での神経細胞死を抑制し、その進行を抑制する治療薬としても有用である可能性が考えられた。



## 総 括

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>などのROSによる酸化ストレスは、パーキンソン病などの神経変性疾患での神経細胞死に深く関与すると考えられている<sup>3-8)</sup>。グリア細胞の一種であるアストロサイトは、脳内の他の細胞に比べGSHの含有量が多く、細胞外のROSの消去や細胞外にGSHを放出することで隣接する神経細胞へシステインを供給し、神経細胞を酸化ストレスによる障害から保護している<sup>12-14)</sup>。したがって、アストロサイトのGSH産生と放出は、神経細胞の生存維持にきわめて重要であり、その機能を促進する生体内機構は、神経変性疾患での神経細胞死を抑制する新たな治療標的となる可能性が考えられる。近年、アストロサイトには、種々の神経伝達物質受容体が発現していることが明らかになり、神経伝達物質によるアストロサイトの機能調節が注目されている。ノルアドレナリンは、神経細胞だけでなく、アストロサイトにも作用し、その機能調節に関わることが示唆されている<sup>19-21)</sup>。また、ノルアドレナリンは、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患において、神経保護作用を有することが示唆されている<sup>22-24)</sup>。これらのことから、ノルアドレナリンは、アストロサイトを介した神経保護作用を有する可能性が考えられる。

本研究では、ノルアドレナリンの神経保護作用を明らかにする目的で、アストロサイトのGSH産生と放出に対するノルアドレナリンの影響及びノルアドレナリンのアストロサイトを介した神経保護作用について検討した。第一章では、ヒトアストロサイトーマU-251 MG細胞と初代培養アストロサイトにおいて、ノルアドレナリンがβ<sub>3</sub>受容体を介してGCLcを発現誘導し、GSH産生を誘導することを示した。また、U-251 MG細胞において、ノルアドレナリンが、細胞外へのGSH放出を促進することを示した。ノルアドレナリンによるGSH産生誘導に関わるβ<sub>3</sub>受容体の下流の細胞内シグナル伝達系を明らかにする目的で、種々のシグナル伝達阻害薬を用いて検討した。その結果、U-251 MG細胞において、ノルアドレナリンは、Gi/o蛋白質を介してERK及びJNKを活性化させること、ERK及びJNKの活性化がノルアドレナリンによるGSHの産生誘導に重要であることを明らかにした。

第二章では、第一章でみられたアストロサイトにおけるノルアドレナリンによるGSH産生誘導と細胞外へのGSH放出の促進が神経細胞の保護に寄与するか否かを明らかにする目的で、U-251 MG細胞とヒトニューロblastoma SH-SY5Y細胞の混合培養系を用いて検討した。その結果、ノルアドレナリンがU-251 MG細胞のβ<sub>3</sub>受容体を介してSH-SY5Y細胞のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>誘発細胞死を抑制することを示した。また、混合培養系においてノルアドレナリンが、SH-SY5Y細胞の細胞内GSH量を増加させることを示した。さらに、混合培養系において、MRP1阻害薬MK571がノルアドレナリンによるSH-SY5Y細胞の細胞内GSH量の増加とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>誘発細胞死の抑制を阻害することを示した。これらの結果は、ノルアドレナリンがU-251 MG細胞のβ<sub>3</sub>受容体を介してGSHを産生誘導することによりMRP1を介したGSHの放出を促進し、SH-SY5Y細胞へのシステイン供給を増加させることにより、SH-SY5Y細胞の細胞内GSH量を増加させ、そのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>誘発細胞死を抑制することを示唆し

ている。このノルアドレナリンによるアストロサイトを介した神経保護作用が初代培養神経細胞においてもみられるか否かについて検討した。その結果、マウス初代培養神経細胞とアストロサイトの混合培養系において、ノルアドレナリンがアストロサイトを介して  $H_2O_2$  誘発細胞死を抑制すること、この細胞死抑制作用が、 $\beta_3$  受容体選択的遮断薬 SR59230A、グルタチオン合成阻害薬 BSO 及び阻害薬 MK571 により阻害されることを示した。これらの第一章と第二章の結果から、ノルアドレナリンは、アストロサイトの  $\beta_3$  受容体を刺激することで GCLc を発現誘導することにより GSH 産生を増加させ、MRP1 を介して細胞外への GSH 放出を促進し、神経細胞にシステインを供給して、神経細胞を酸化的ストレス誘発細胞死から保護することが考えられた (Fig. 36)。

第三章では、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬が脳内 GSH 量を増加させ神経細胞保護作用を示すか否かについて検討した。マウスの脳における  $\beta_3$  受容体の発現を検討した結果、嗅球、前頭葉、大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、中脳背側部、中脳腹側部、小脳、橋・延髄の各部位において、 $\beta_3$  受容体蛋白質が発現していることを示した。また、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬 SR58611A の投与により、嗅球、大脳皮質、海馬、線条体、視床下部、中脳腹側部での組織内 GSH 量が増加すること、それらの部位における GCLc の発現量が増加することを明らかにした。これらの結果は、嗅球、前頭葉、大脳皮質、線条体、視床下部、中脳腹側部では、SR58611A の投与により、アストロサイトの  $\beta_3$  受容体が刺激されることで GCLc が発現誘導され、GSH 量が増加することを示唆している。また、SR58611A の反復前投与により、MPTP 誘発ドパミン神経細胞死が抑制されることを明らかにした。以上の結果より、SR58611A は、黒質での GSH 量を増加させることにより、MPTP によるドパミン神経細胞死を抑制することが示唆された。

パーキンソン病患者の脳では、GSH 量が著明に減少しており、酸化的ストレスがドパミン神経細胞死に関与すると考えられている<sup>75-77)</sup>。本研究の結果から、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬は、パーキンソン病患者の脳で減少した GSH 量を回復することにより酸化的ストレスによるドパミン神経細胞死を抑制し、疾患の進行を抑制する治療薬となる可能性が考えられた。今後、臨床研究により、パーキンソン病の進行を抑制する治療薬としての  $\beta_3$  受容体選択的作用薬の有用性が明らかにされ、その治療に貢献することが期待される。



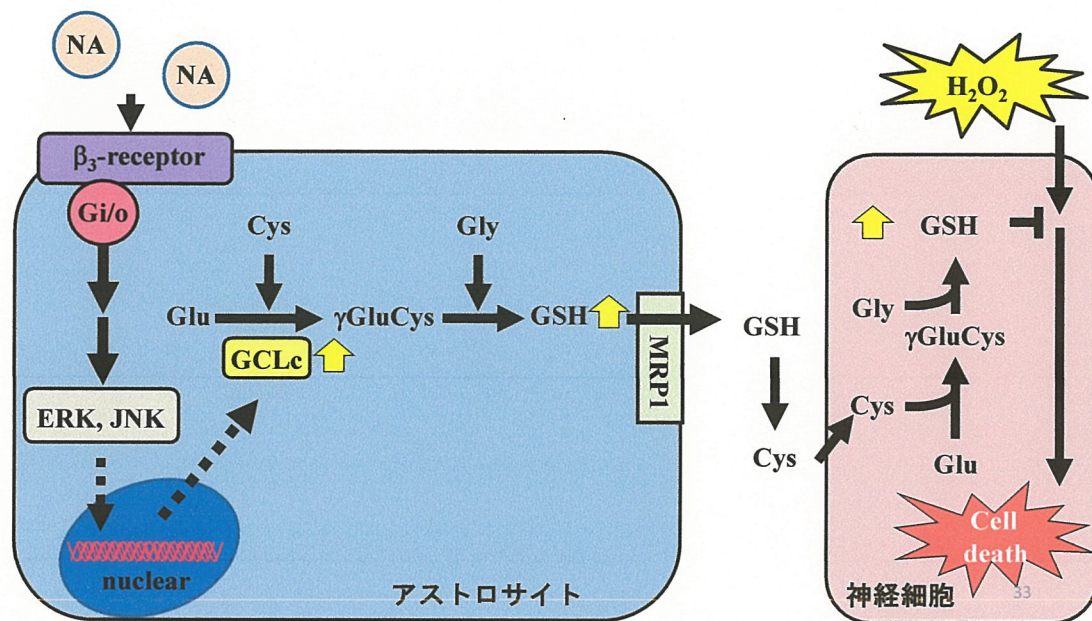


Figure 36. A schematic representation of astrocyte-mediated neuroprotection by noradrenaline (NA).



## 謝辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました、摂南大学大学院薬学研究科薬物治療学研究室教授、前田定秋先生に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、直接ご指導戴きました摂南大学大学院薬学研究科薬物治療学研究室准教授、吉岡靖啓先生に深謝致します。

また、本研究を進めるにあたり、ご討論、ご指導戴きました摂南大学大学院薬学研究科薬物治療学研究室助教、山室晶子先生、同助教、石丸侑希先生に感謝致します。

社会人大学院進学を支援して下さいました、塚本有子薬剤部長を始めとする近江八幡市立総合医療センター薬剤部の皆様、職場の皆様に感謝致します。

最後に多大なるご協力とご援助戴きました、茂木俊樹修士、辻本理絵学士、森下あみ学士、白敷千春学士、生田恵梨子学士、根来亮介学士、平野優学士を始めとする摂南大学薬学部薬物治療学研究室の皆様に感謝致します。

## 引用文献

1. Clarke, D. D. and Sokoloff, L. Circulation and energy metabolism of the brain. In: Siegel G, Agranoff, B., Albers, R. W., et al, editors. Basic Neurochemistry:Molecular, Cellular, and Medical Aspects. 6th ed. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven; (1999). p. 637-669.
2. Mattson, M. P. and Magnus, T. (2006). Ageing. and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci.*, **7**, 278-94.
3. Kim, GH., Kim, J. E., Rhie, S. J. and Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol.*, **24**, 325-40.
4. Yamagata, T., Satoh, T., Ishikawa, Y., Nakatani, A., Yamada, M., Ikeuchi, T. and Hatanaka, H. (1999). Brain-derived neurotrophic factor prevents superoxide anion-induced death of PC12h cells stably expressing TrkB receptor via modulation of reactive oxygen species. *Neurosci Res.*, **35**, 9-17.
5. Wilson, J. X. (1997) . Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **75**, 1149–1163.
6. Jenner, P. and Olanow, C.W. (1996). Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology.*, **47**, (6 Suppl 3):S161-70.
7. Zhao, Y. and Zhao, B. (2013) Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev.*, **2013**, 316523.
8. Emerit, J., Edeas, M., and Bricaire, F. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother.*, **58**, 39-46.
9. Radad, K., Rausch, W. D. and Gille, G. (2006) Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochem Int.*, **49**, 379-86.
10. Xu, P., Wang, H. and Li Z. Yang Z. (2015). Triptolide attenuated injury via inhibiting oxidative stress in amyloid-Beta25-35-treated differentiated PC12 cells.
11. Lewerenz, J. and Maher, P. (2015). Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Front Neurosci.*, **16**, 9-469.
12. Tsuchioka, M., Takebayashi, M., Hisaoka, K., Maeda, N. and Nakata, Y. (2008). Serotonin (5-HT) induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA expression via the transactivation of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in rat C6 glioma cells. *J Neurochem.*, **106**, 244-57.
13. Olsen, M. L., Khakh, B. S., Skatchkov, S. N., Zhou, M., and Lee, C.J. and Rouach, N. (2015). New Insights on Astrocyte Ion Channels: Critical for Homeostasis and Neuron-Glia Signaling. *J Neurosci.*, **35**, 13827-35.



14. Gras, G., Porcheray, F., Samah, B. and Leone, C. (2006). The glutamate-glutamine cycle as an inducible, protective face of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* **80**, 1067-75.
15. Dringen, R. and Hirrlinger, J. (2003). Glutathione pathways in the brain. *Biol. Chem.*, **384**, 505-16.
16. Gabryel, B. and Trzeciak, H. I. (2001). Role of astrocytes in pathogenesis of ischemic brain injury. *Neurotox. Res.*, **3**, 205-21.
17. Kwon, Y. W., Masutani, H., Nakamura, H., Ishii, Y. and Yodoi, J. (2003). Redox regulation of cell growth and cell death. *Biol. Chem.* **384**, 991-996.
18. Dringen, R., (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.*, **62**, 649-671.
19. O'Donnell, J., Zeppenfeld, D., McConnell, E., Pena, S. and Nedergaard, M. (2012). Norepinephrine: aneuro modulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem. Res.*, **37**, 2496-2512.
20. Reyes, B. A., Heldt, N. A., Mackie, K. and Van Bockstaele, E. J. (2015). Ultrastructural evidence for synaptic contacts between cortical noradrenergic afferents and endocannabinoid-synthesizing post-synaptic neurons. *Neuroscience.*, **10**, 303:323-37.
21. Fahrig, T. (1993). Receptor subtype involved and mechanism of norepinephrine-induced stimulation of glutamate uptake into primary cultures of rat brain astrocytes. *Glia.*, **7**, 212-218.
22. Hajek, I., Subbarao, K. V. and Hertz, L. (1996). Acute and chronic effects of potassium and noradrenaline on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in cultured mouse neurons and astrocytes. *Neurochem. Int.*, **28**, 335-342.
23. Juric, D. M., Loncar, D. and Carman-Krzan, M. (2008). Noradrenergic stimulation of BDNF synthesis in astrocytes: mediation via alpha1- and beta1/beta2-adrenergic receptors. *Neurochem. Int.*, **52**, 297-306.
24. Elena, M. V., Vanessa, K. H., Ann-Charlotte, G., Mark, A. E. and Gary, A. J. (2012). Nor epinephrine in neurodegeneration: at coerulean target. *J. Alzheimers Dis.*, **2**, e114.
25. Hawkes, C. H., DelTredici, K. and Braak, H. (2010). A timeline for Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.*, **16**, 79-84.
26. Marien, M. R., Colpaert, F. C. and Rosenquist, A. C. (2004). Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *BrainRes. BrainRes. Rev.* **45**, 38-78.
27. Heneka, M. T., Ramanathan, M., Jacobs, A. H., Dumitrescu-Ozimek, L., Bilkei-Gorzo, A., Debeir, T., Sastre, M., Galldiks, N., Zimmer, A., Hoehn, M., Heiss, W. D., Klockgether, T. and Staufenbiel, M., (2006). Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J. Neurosci.*, **26**, 1343-1354.
28. Marien, M., Briley, M. and Colpaert, F. (1993). Noradrenaline depletion exacerbates MPTP-induced striatal dopamine loss in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **236**, 487-489.



29. Fornai, F., Alessandrì, M.G., Torracca, M. T., Bassi, L. and Corsini, G. U. (1997). Effects of noradrenergic lesions on MPTP/MPP+ kinetics and MPTP-induced nigrostriatal dopamine depletions. *J. Pharmacol Exp Ther.*, **283**, 100-7.
30. Kim, R. H., Smith, P. D., Aleyasin, H., Hayley, S., Mount, M. P., Pownall, S., Wakeham, A., You-Ten, A. J., Kalia, S. K., Horne, P., Westaway, D., Lozano, A. M., Anisman, H., Park, D. S. and Mak, T. W., (2005). Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **102**, 5215-20.
31. Hartl, D., Schuldt, V., Forler, S., Zabel, C., Klose, J. and Rohe, M. (2012). Presymptomatic alterations in energy metabolism and oxidative stress in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *J. Proteome Res.*, **11**, 3295-3304.
32. Aoyama, K., Watabe, M. and Nakaki, T. (2008). Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci.*, **108**, 227-38.
33. Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging.*, **2**, 219-236
34. Meister A. and Anderson M. E. (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 711-60.
35. Dringen, R., Gutterer, J. M. and Hirrlinger, J. (2000). Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem.*, **267**, 4912-6.
36. Wang, X. F. and Cynader, M. S. (2000). Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *J Neurochem.*, **74**, 1434-42.
37. Dringen, R. and Hirrlinger, J. (2003). Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem.*, **384**, 505-16.
38. Dringen, R., Kussmaul, L., Gutterer, J. M., Hirrlinger, J. and Hamprecht, B. (1999). The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem.*, **72**, 2523-30.
39. Liu, X., Shibata, T., Hisaka, S., Kawai, Y. and Osawa, T. (2008). DHA Hydroperoxides as a Potential Inducer of Neuronal Cell Death: a Mitochondrial Dysfunction-Mediated Pathway. *J Clin Biochem Nutr.*, **43**, 26-33.
40. Hertz, L., Lovatt, D., Goldman, S. A. and Nedergaard, M. (2010). Adrenoceptors in brain: cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *Neurochem Int.*, **57**, 411-20.
41. Tripathi, A., Gaponenko, V. and Majetschak, M. (2015). Commercially available antibodies directed against  $\alpha$ -adrenergic receptor subtypes and other G protein-coupled receptors with acceptable selectivity in flow cytometry experiments. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* [Epub ahead of print]

42. Catus, S. L., Gibbs, ME., Sato, M., Summers, R.J. and Hutchinson, D.S. (2011). Role of  $\beta$ -adrenoceptors in glucose uptake in astrocytes using  $\beta$ -adrenoceptor knockout mice. *Br J Pharmacol.*, **162**, 1700-15.
43. Yoshioka, Y., Kitao, T., Kishino, T., Yamamuro, A. and Maeda, S. (2006). Nitric oxide protects macrophages from hydrogen peroxide-induced apoptosis by inducing the formation of catalase. *J. Immunol.* **176**, 4675-4681.
44. Steele, M. L., Fuller, S., Patel, M., Kersaitis, C., Ooi, L. and Münch, G. (2013). Effect of Nrf2 activators on release of glutathione, cysteinylglycine and homocysteine by human U373 astroglial cells. *Redox Biol.*, **1**, 441-5.
45. Mersmann, H. J. (1998). Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *J. Anim. Sci.*, **76**, 160-172.
46. Scarpace, P. J., Dove, J. and Matheny, M. (1996). Effects of age on beta adrenergic subtype activation of adenylyl cyclase in brown adipose tissue. *Proc Soc Exp Biol Med.*, **213**, 262-7.
47. Mizuno K, Kanda Y, Kuroki Y, Watanabe Y. (2000). The stimulation of beta(3)-adrenoceptor causes phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 through a G(s)- but not G(i)-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol.*, **15**, 404(1-2):63-8.
48. Dickinson, D. A., Iles, K. E., Watanabe, N., Iwamoto, T., Zhang, H., Krzywanski, DM., and Forman, H. J. (2002). 4-hydroxynonenal induces glutamate cysteine ligase through JNK in HBE1 cells. *Free Radic Biol Med.*, **33**, 974.
49. Lee, Y. J., Kang, I. J., Bünger, R. and Kang, Y. H. (2004). Enhanced survival effect of pyruvate correlates MAPK and NF-kappaB activation in hydrogen peroxide-treated human endothelial cells. *J Appl Physiol* (1985)., **96**, 793-801.
50. Chernogubova, E., Cannon, B. and Bengtsson, T. (2004). Norepinephrine increases glucose transport in brown adipocytes via beta3-adrenoceptors through a cAMP, PKA, and PI3-kinase-dependent pathway stimulating conventional and novel PKCs. *Endocrinology.*, **145**, 269-280.
51. Collins, S. (2012).  $\beta$ -Adrenoceptor signaling Networks in Adipocytes for Recruiting Stored Fat and Energy Expenditure. *Front. Endocrinol.*, **2**, 102.
52. Williams, N. G., Zhong, H. and Minneman, K. P., (1998). Differential coupling of alpha1-, alpha2-, and beta-adrenergic receptors to mitogen-activated protein kinase pathways and differentiation in transfected PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 24624-24632 (PubMed:9733758).
53. Kaya, A. I., Onaran, H. O., Özcan, G., Ambrosio, C., Costa, T., Balli, S. and Ugur, Ö., (2012). Cell contact-dependent functional selectivity of  $\beta$ 2-adrenergic receptor ligands in stimulating cAMP accumulation and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **287**, 6362-6374.



54. Yaniv, S. P., Lucki, A., Klein, E. and Ben-Shachar, D. (2010). Dexamethasone enhances the norepinephrine-induced ERK/MAPK intracellular pathway possibly via dysregulation of the  $\alpha$ 2-adrenergic receptor: implications for antidepressant drug mechanism of action. *Eur.J.CellBiol.* **89**, 712-722.
55. Sugimoto, T., Morioka, N., Sato, K., Hisaoka, K. and Nakata, Y. (2011). Noradrenergic regulation of period1 expression in spinal astrocytes is involved in protein kinase A, c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase activation mediated by  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 2-adrenoceptors. *Neuroscience.* **185**, 1-13.
56. Akinaga, J., Lima, V., Kiguti, L. R., Hebeler-Barbosa, F., Alcántara-Hernández, R., García-Sáinz, J. A. and Pupo, A. S., (2013). Differential phosphorylation, desensitization, and internalization of  $\alpha$ 1A-adrenoceptors activated by norepinephrine and oxymetazoline. *Mol.Pharmacol.*, **83**, 870-881.
57. Bobik, A., Campbell, J. H. and Little, P. J. (1984). Desensitization of the  $\alpha$ 1 adrenoceptor system in vascular smooth muscle. *Biochem.Pharmacol.*, **33**, 1143-1145.
58. Eason, M. G. and Liggett, S. B., (1992). Subtype-selective desensitization of  $\alpha$ 2-adrenergic receptors. Different mechanisms control short and long term agonist-promoted desensitization of  $\alpha$ 2C10,  $\alpha$ 2C4, and  $\alpha$ 2C2. *J. Biol. Chem.*, **267**, 25473-25479.
59. Olli-Lähdesmäki, T., Tiger, M., Vainio, M., Scheinin, M. and Kallio, J. (2004). Ligand-induced  $\alpha$ 2-adrenoceptor endocytosis: relationship to Gi protein activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 226-233.
60. Wang, Y., DeArcangelis, V., Gao, X., Ramani, B., Jung, Y. S. and Xiang, Y. (2008). Norepinephrine- and epinephrine-induced distinct  $\beta$ 2-adrenoceptor signaling is dictated by GRK2 phosphorylation in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.*, **283**, 1799-1807.
61. Chaudhry, A. and Granneman, J. G. (1994). Influence of cell type upon the desensitization of the  $\beta$ 3-adrenergic receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 1253-1258.
62. Jockers, R., DaSilva, A., Strosberg, A. D., Bouvier, M. and Marullo, S. (1996). New molecular and structural determinants involved in  $\beta$ 2-adrenergic receptor desensitization and sequestration. Delineation using chimeric  $\beta$ 3/ $\beta$ 2-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.*, **271**, 9355-9362.
63. Day, R. M., Suzuki, Y. J., Lum, J. M., White, A. C., Fanburg, B. L. (2002). Bleomycin upregulates expression of gamma-glutamylcysteine synthetase in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **282**, L1349-1357.
64. Kawakita, Y., Ikekita, M., Kurozumi, R., Kojima, S. (2003). Increase of intracellular glutathione by low-dose gamma-ray irradiation is mediated by transcription factor AP-1 in RAW 264.7 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 19-23.
65. Kurozumi, R. and Kojima, S. (2005). Increase of intracellular glutathione by low-level NO



- mediated by transcription factor NF-kappaB in RAW 264.7 cells. *Biochim.Biophys., Acta* **1744**, 58-67.
66. Gavriluk, V., DelloRusso, C., Heneka, M. T., Pelligrino, D., Weinberg, G. and Feinstein, D. L. (2002). Norepinephrine increases I kappa B alpha expression in astrocytes. *J. Biol. Chem.*, **277**, 29662-29668.
  67. Jhang, K. A., Lee, E. O., Kim, H. S. and Chong, Y. H. (2014). Norepinephrine provides short-term neuroprotection against A $\beta$ 1-42 by reducing oxidative stress independent of Nrf2 activation. *Neurobiol. Aging.*, **35**, 2465-2473.
  68. Karin, M., (1996). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. BBiol. Sci.*, **351**, 127-134.
  69. Whitmarsh, A. J., Davis, R. J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* **74**, 589-607
  70. Rathinam, M. L., Watts, L. T., Narasimhan, M., Riar, A.K., Mahimainathan, L. and Henderson, G. I. (2012). Astrocyte mediated protection of fetal cerebral cortical neurons from rotenone and paraquat. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **33**, 353-60.
  71. Canals, S., Casarejos, M. J., Rodríguez-Martín, E., de Bernardo, S. and Mena, M. A. (2001). Neurotrophic and neurotoxic effects of nitric oxide on fetal midbrain cultures. *J. Neurochem.*, **76**, 56-68.
- 2 章
72. Ben-Yoseph, O., Boxer, P.A. and Ross, B. D. (1996). Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress. *J. Neurochem.*, **66**, 2329-37.
  73. Fuson, K. S., Mark, R. J., Panetta, J. A. and May, P. C. (1999). Characterization of LY231617 protection against hydrogen peroxide toxicity. *J. Neurochem.*, **72**, 1154-60.
  74. Brandmann, M., Tulpule, K., Schmidt, M. M. and Dringen, R. (2012). The antiretroviral protease inhibitors indinavir and nelfinavir stimulate Mrp1-mediated GSH export from cultured brain astrocytes. *J. Neurochem.* **120**, 78-92.
  75. Cole, SP. (2014). Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a "multitasking" ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J. Biol. Chem.*, **289**, 30880-8.
  76. Hohnholt, M. C. and Dringen, R. (2014). Short time exposure to hydrogen peroxide induces sustained glutathione export from cultured neurons. *Free. Radic. Biol. Med.*, **70**, 33-44.
  77. Troadec, J.D., Marien, M., Darios, F., Hartmann, A., Ruberg, M., Colpaert, F. and Michel, P. P. (2001). Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress. *J. Neurochem.*, **79**, 200-10.
  78. Huang, R. P., Fan, Y., Hossain, M.Z., Peng, A., Zeng, Z. L. and Boynton A. L. (1998). Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43).

*Cancer. Res.*, **58**, 5089-96.

79. Izzo, G., d'Istria, M., Ferrara, D., Serino, I., Aniello, F. and Minucci, S., (2006). Connexin 43 expression in the testis of the frog *Rana esculenta*. *Zygote.*, 14, 349-57.
80. Fahn, S. and Cohen, G. (1992). The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann. Neurol.*, **32**, 804-12.
81. Bains, J. S. and Shaw, C. A. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev.*, 25, 335-58.
82. Younes-Mhenni, S., Frih-Ayed, M., Kerkeni, A., Bost, M. and Chazot, G. (2007). Peripheral blood markers of oxidative stress in Parkinson's disease. *Eur Neurol.*, 58, 78-83.
83. Rommelfanger K. S., Weinshenker, D. (2007). Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol.*, 74, 177-90.
- 3 章
84. Luo, S. X. and Huang, E. J. (2015). Dopaminergic Neurons and Brain Reward Pathways: From Neurogenesis to Circuit Assembly. *Am. J. Pathol.*, pii: S0002-9440(15)00646-X.
85. B, Thanvi. and T, Lo. (2004). Long term motor complications of levodopa: clinical features, mechanisms, and management strategies. *Postgrad. Med. J.*, **80**, 452-458.
86. Dovero, S., Gross, C. and Bezard, E. (2015). Unexpected toxicity of very low dose MPTP in mice: A clue to the aetiology of Parkinson's disease? *Synapse.*, doi: 10.1002/syn.21875.
87. Jackson-Lewis, V. and Przedborski, S. (2007). Protocol for the MPTP model of Parkinson's disease. *Nat. Protoc.*, 2, 141-151.
88. Abou-Sleiman, P. M., Muqit, M. M. and Wood, N.W. (2006). Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 207-219.
89. Zorov, D. B., Juhaszova, M. and Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.*, 94, 909-50.
90. Himeda, T., Kadoguchi, N., Kamiyama, Y., Kato, H., Maegawa, H. and Araki, T. (2006). Neuroprotective effect of arundic acid, an astrocyte-modulating agent, in mouse brain against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity. *Neuropharmacology.*, **50**, 329-44.
91. Claustre, Y., Leonetti, M., Santucci, V., Bougault, I., Desvignes, C., Rouquier, L., Aubin, N., Keane, P., Busch, S., Chen, Y., Palejwala, V., Tocci, M., Yamdagni, P., Didier, M., Avenet, P., Le Fur, G., Oury-Donat, F., Scatton, B. and Steinberg, R. (2008). Effects of the beta3-adrenoceptor (Adrb3) agonist SR58611A (amibegron) on serotonergic and noradrenergic transmission in the rodent: relevance to its antidepressant/anxiolytic-like profile. *Neuroscience.*, **156**, 353-64.
92. Tanyeri, P., Buyukokuroglu, M. E., Mutlu, O., Ulak, G., Akar, F. Y., Celikyurt, I. K. and Erden, B. F. (2013). Evidence that the anxiolytic-like effects of the beta3 receptor agonist amibegron



- involve serotonergic receptor activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **110**, 27-32.
91. Tanyeri, P., Buyukokuroglu, M. E., Mutlu, O., Ulak, G., Yıldız Akar, F., Komsuoglu Celikyurt. I. and Erden, B. F. (2013). Involvement of serotonin receptor subtypes in the antidepressant-like effect of beta receptor agonist Amibegron (SR 58611A): an experimental study. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **105**, 12-6.
  92. Tamburella, A., Micale, V., Leggio, G.M. and Drago, F. (2010). The beta3 adrenoceptor agonist, amibegron (SR58611A) counteracts stress-induced behavioral and neurochemical changes. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **20**, 704-13.
  93. Ropert, N., Jalil, A. and Li, D. (2015). Expression and cellular function of vSNARE proteins in brain astrocytes. *Neuroscience*, pii: S0306-4522(15)00955-0.
  94. Jahn, H.M., Scheller, A. and Kirchhoff, F. (2015). Genetic control of astrocyte function in neural circuits. *Front Cell Neurosci.*, **9**, 310.
  95. Zerlin, M., Levison, S.W. and Goldman, J.E. (1995). Early patterns of migration, morphogenesis, and intermediate filament expression of subventricular zone cells in the postnatal rat forebrain. *J. Neurosci.*, **15**, 7238-49.
  96. Xu, C., Funahashi, Y., Watanabe, T., Takano, T., Nakamuta, S., Namba, T., Kaibuchi, K., (2015). Radial Glial Cell-Neuron Interaction Directs Axon Formation at the Opposite Side of the Neuron from the Contact Site. *J. Neurosci.*, **35**, 14517-32.
  97. Guillem, A. M., Martínez-Lozada, Z., Hernández-Kelly, L. C., López-Bayghen, E., López-Bayghen, B., Calleros, O.A., Campuzano, M. R. and Ortega, A. (2015). Methylphenidate Increases Glutamate Uptake in Bergmann Glial Cells. *Neurochem. Res.*, **40**, 2317-24.
  98. Xu, C., Funahashi, Y., Watanabe, T., Takano, T., Nakamuta, S., Namba, T. and Kaibuchi, K. (2015). Radial Glial Cell-Neuron Interaction Directs Axon Formation at the Opposite Side of the Neuron from the Contact Site. *J. Neurosci.*, **35**, 14517-32.
  99. Goldstein, D. S. (2006). L-Dihydroxyphenylserine (L-DOPS): a norepinephrine prodrug. *Cardiovasc Drug Rev.*, **24**, 189-203.
  100. Fukada, K., Endo, T., Yokoe, M., Hamasaki, T., Hazama, T. and Sakoda, S. (2013). L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine (L-DOPS) co-administered with entacapone improves freezing of gait in Parkinson's disease. *Med Hypotheses*, **80**, 209-12.
  101. Tong, J., Hornykiewicz, O. and Kish, S.J. (2006). Inverse relationship between brain noradrenaline level and dopamine loss in Parkinson disease: a possible neuroprotective role for noradrenaline. *Arch Neurol.*, **63**, 1724-8.
  102. Ádori, C., Glück, L., Barde, S., Yoshitake, T., Kovacs, G. G., Mulder, J., Maglóczy, Z., Havas, L., Bölcskei, K., Mitsios, N., Uhlén, M., Szolcsányi, J., Kehr, J., Rönnbäck, A., Schwartz, T., Rehfeld, J. F., Harkany, T., Palkovits, M., Schulz, S. and Hökfelt, T. (2015). Critical role of somatostatin receptor 2 in the vulnerability of the central noradrenergic system: new aspects on



- Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, **129**, 541-63.
103. Pamphlett, R. and Kum Jew, S. (2015). Different Populations of Human Locus Ceruleus Neurons Contain Heavy Metals or Hyperphosphorylated Tau: Implications for Amyloid- $\beta$  and Tau Pathology in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.*, **45**, 437-47.
  104. Puertas MC1, Martínez-Martos JM, Cobo MP, Carrera MP, Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ. (2012). Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. *Exp Gerontol.*, **47**, 625-30.
  105. Sørensen, L., Igel, C., Liv Hansen, N., Osler, M., Lauritzen, M., Rostrup, E. and Nielsen, M. (2015). Early detection of Alzheimer's disease using MRI hippocampal texture. *Hum Brain Mapp.*,
  106. Cortical correlates of affective syndrome in dementia due to Hayata TT, Bergo FP, Rezende TJ, Damasceno A, Damasceno BP, Cendes F, Stella F, Balthazar ML. (2015). Alzheimer's disease. *Arq Neuropsiquiatr.*, **73**, 553-60.
  107. Tagawa, R., Hashimoto, H., Matsuda, Y., Uchida, K., Yoshida, A., Higashiyama, S., Kawabe, J., Toshihiro, K., Shiomi, S., Mori, H. and Inoue, K. (2014). Correlation between right medial temporal lobe atrophy and persecutory delusions in patients with dementia of the Alzheimer's type demonstrated on VSRAD advance. *Osaka City Med. J.*, 2014 **60**, 73-80.
  108. Paquet, C., Amin, J., Mouton-Liger, F., Nasser, M., Love, S., Gray, F., Pickering, R. M., Nicoll, J. A., Holmes, C., Hugon, J. and Boche, D. (2015). Effect of active A $\beta$  immunotherapy on neurons in human Alzheimer's disease. *J. Pathol.*, 235, 721-30.
  109. Shoji, M. (2014). Alzheimer's disease: a type of cerebral amyloidosis. *Brain Nerve.*, 66, 837-47.

